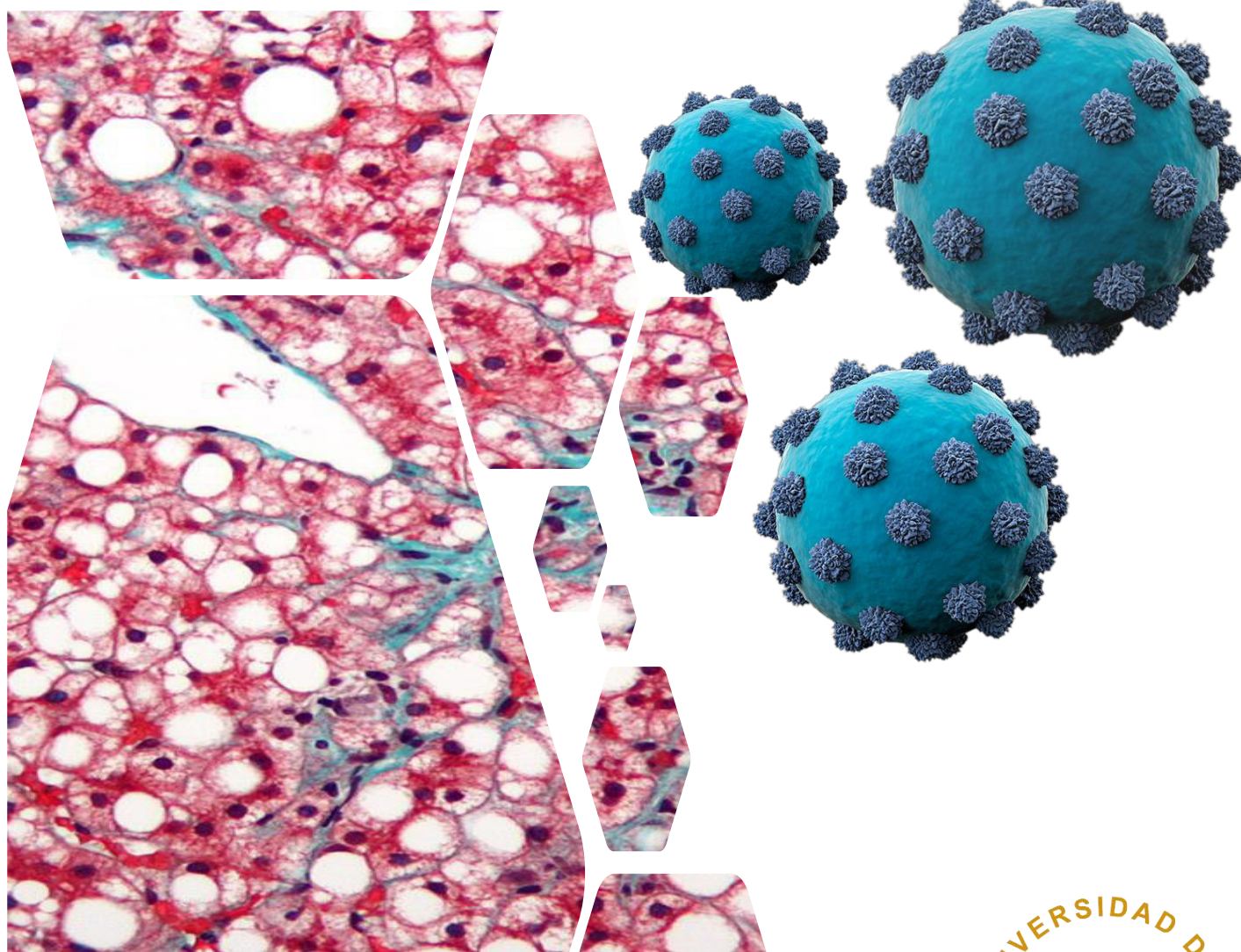


**Extractos de *Agaricus bisporus* como moduladores de la replicación del virus de la Hepatitis C y de la progresión de la fibrosis hepática, inflamación y estrés oxidativo.
Papel del complejo NLRP3 inflammasoma en la enfermedad hepática.**



Paloma Gallego Yerga

Tesis Doctoral

Sevilla, 2020

ciberehd





*UGC de Enfermedades Digestivas
& CIBERehd*

Extractos de *Agaricus bisporus* como moduladores de la replicación del virus de la hepatitis C y de la progresión de la fibrosis hepática, inflamación y estrés oxidativo. Papel del complejo NLRP3 inflamasoma en la enfermedad hepática.

TESIS DOCTORAL

Paloma Gallego Yerga

Sevilla, 2020



*UGC de Enfermedades Digestivas
& CIBERehd*

Extractos de *Agaricus bisporus* como moduladores de la replicación del virus de la hepatitis C y de la progresión de la fibrosis hepática, inflamación y estrés oxidativo. Papel del complejo NLRP3 inflamasoma en la enfermedad hepática.

Memoria presentada por la
Graduada Paloma Gallego Yerga
para optar al título de Doctora por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2020

El presente trabajo ha sido realizado por la Graduada en Bioquímica Paloma Gallego Yerga, con DNI 28836549-T, en la Unidad Clínica de Gestión (UCG) de Enfermedades Digestivas & CIBERehd del Hospital Universitario Ntra. Sra. Virgen de Valme, Sevilla, bajo la dirección del Dr. José Antonio del Campo Castillo y de la Dra. Lourdes Grande Santamaría.

Los directores del trabajo:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. A. del Campo Castillo', with a long horizontal stroke extending to the left.

Fdo.: Dr. José Antonio del Campo Castillo

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'L. Grande Santamaría', with a large circular loop and a horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Dra. Lourdes Grande Santamaría

AGRADECIMIENTOS

Iniciar un camino que no cuenta con senderos marcados, en el que las señales a veces son contradictorias y dónde los pasos pueden ir en más de un sentido, habría sido mucho más complicado sin el apoyo de todas las personas que me han acompañado y me han dado la mano en su recorrido, haciendo de esta tesis doctoral un verdadero camino de aprendizaje y maduración. Lejos de limitarse a un trabajo de investigación con aportes a la ciencia, tecnología y/o humanidades, la tesis doctoral se convierte en un tramo importante de la vida en el que el crecimiento a nivel profesional y personal se hace muy presente. Y como toda parte o experiencia de vida, no podría existir, como ya apuntaba al inicio, sin los consejos, mensajes de ánimo, palabras de comprensión, señales de guía y el apoyo incondicional de mis directores de tesis, tutor, colaboradores, compañeros, amigos y familiares a los que van dedicadas estas palabras de agradecimiento. Sin vosotros y vosotras nada de esto habría sido posible.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de Tesis, José Antonio del Campo Castillo, por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto y haber apostado por mí desde el primer minuto, cuando comenzaba el máster y aún faltaba mucho por aprender. Gracias por tu dedicación infinita y toda la ayuda aportada, por tu implicación y tiempo dedicado para la realización de mi tesis doctoral. Gracias, en definitiva, por servirme de guía en este camino cuando me encontraba perdida, y por brindarme tu confianza y una libertad que me han hecho crecer y madurar como investigadora. Porque me has enseñado que, en ciencia, aunque se podría aplicar a cualquier ámbito profesional y personal, hay que saber, saber hacer y saber ser. Gracias.

Agradecer también a mi codirectora, Lourdes Grande Santamaría, por la dirección durante el desarrollo de este trabajo, por el apoyo y la confianza depositada en mi investigación, por cada detalle y momento dedicado, por su criterio y el aliento recibido para poder culminar mi tesis

doctoral. Gracias a José Carlos Palomares Foliá por su tutela, por todas las facilidades que me ha brindado y por su amabilidad y disponibilidad en cualquier momento que fuese preciso.

A ellos, mis directores y tutor de tesis, también les debo la riqueza, en cuanto a grupos de investigación se refiere, de la que he disfrutado en estos años. Y es que la colaboración ha sido tan estrecha e intensa, que me siento más compañera que colaboradora en algunos grupos con los que he tenido el placer de trabajar. Por ello, agradezco a Jordi Muntané Relat el haberme acogido en su grupo de investigación como a una más, prácticamente desde el inicio de mi tesis, y haber ejercido en numerosas ocasiones como un segundo tutor, guiándome y ayudándome a resolver cualquier problema, apostando por mí y enseñándome cómo hacer buena ciencia. Puede que oficialmente no sea componente de este grupo, pero extraoficialmente todos sus integrantes se han convertido en mis verdaderos compañeros y compañeras de laboratorio.

Por ello, muchísimas gracias a María Ángeles Rodríguez por acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio, sobre todo con el Western Blot y esos anticuerpos fosforilados de AMPk que nos traían de cabeza. Eres un ejemplo a seguir como profesional y como persona, por tu esfuerzo constante y tu trabajo riguroso que tan bien has sabido transmitirme, por tu capacidad para hacer mil cosas a la vez y tener aún tiempo para ayudar a los demás, siempre con esa alegría que te caracteriza. Gracias por tu paciencia y tu claridad, por salvarme de tantas dudas las primeras veces, explicándome todos los protocolos perfectamente, y, en definitiva, por ser como eres.

Y junto con María Ángeles, forman un excelente grupo de compañeros y amigos Elena, Álvaro, Patri, María, Sheila, Laura... Cuánto tengo que agradecerlos. Habéis sido un pilar importante en estos años, ya no sólo por la ayuda que entre todos nos brindábamos en el laboratorio, sino porque habéis sido arropo, compañía y los que mejor podíais ponerlos en mi piel en momentos de agobio y de incertidumbre. Guardaré con mucho cariño todas las risas, los desayunos, las comidas de Navidad, las ferias, y, en resumen, todos los ratitos tan agradables que me habéis hecho pasar,

porque trabajar con vosotros ha sido un verdadero placer. Sois un equipo imparable de personas muy valiosas, con una gran fortaleza y capaces de todo, y eso ha sido concretamente lo que me habéis transmitido y aportado en ingentes cantidades. Por todo eso, y más, muchísimas gracias.

No podría continuar sin agradecer a un segundo grupo de investigación, el grupo de Juan Bautista, por recibirme como a una integrante más en cada colaboración. Cuánta generosidad y sabiduría brotan en ti, Juan. Desde que fuiste mi profesor durante el grado de Bioquímica, en la asignatura de Enzimología, comencé a admirar tu trabajo, tu rigurosidad y tu buen hacer de la ciencia. A eso le siguió el ser el tutor de mi primer gran trabajo de investigación, mi Trabajo Fin de Grado, en el cual me metí de lleno en este mundo, en el conocimiento de las enfermedades hepáticas y en el amor por la investigación. Me has enseñado muchísimo, dándome la capacidad de trabajar con autonomía y soltura, recomendándome a otros investigadores, como a José Antonio, para que siguiera creciendo y aprendiendo. Recuerdo que, en el primer verano tras graduarme, me animaste a escribir un borrador de artículo científico sobre mis resultados del trabajo final de grado. Reconozco que al principio me vi perdida, pero no sabes cuánto agradezco que me hicieras esa propuesta, porque a día de hoy, ese borrador es un artículo publicado, y ya no le tengo ningún miedo a escribir un artículo científico desde cero. Por todo ello, gracias.

Y como no, gracias a Gonzalo y Pilar, integrantes fundamentales del grupo de Juan. Gonzalo fue uno de mis primeros compañeros de laboratorio cuando aún era alumna interna, y continuó ayudándome en todo lo que estuvo en su mano, descubriéndome sus trucos científicos y mostrándome que el orden también existe en el caos de un laboratorio. Gracias a Pilar por sus consejos y el apoyo, por todo lo que he podido aprender de ella y por la atención y el cariño con los que siempre me ha tratado.

He de agradecer a todos aquéllos con los que he tenido la suerte de colaborar:

A Franz Martín Bermudo por el proyecto de colaboración sobre la modulación de la fibrosis hepática en un modelo animal, colaboración sin la cual una parte de mi tesis no habría sido posible. Gracias a él por las orientaciones y la organización del proyecto, y, en especial, a Amparo Luque por su impecable trabajo y su dedicación a tiempo completo. Me has transmitido tu pasión por la ciencia, trabajando contigo en una sintonía perfecta en la que la ayuda era mutua. Hemos pasado muchos ratitos en esa biblioteca junto al río, ratitos de revisión y puestas en común de resultados, y ratitos de anécdotas, charlas y consejos. Gracias.

A Mario Cordero por el proyecto de colaboración sobre el papel del complejo NLRP3 inflamasoma en la enfermedad hepática. Gracias por acercarme tus ideas y tus conocimientos, porque he podido aprender de ellos y sacarles todo su jugo.

A Jordi Muntané, aunque ya lo nombré antes, por las colaboraciones relacionadas con el hepatocarcinoma, en las cuales he podido aprender, desarrollar y profundizar en nuevas técnicas y uso de instrumentos de laboratorio, además de participar en numerosas actividades científicas que han mejorado mi experiencia profesional.

A mis amigos, mis doce Cabras Montesas que me han acompañado desde el primer año de carrera, y con los que aún sigo compartiendo momentos que guardar para toda la vida. ¿Recordáis cuando, en el cuarto año del carrera, nos dijeron que de todos los de la clase, sólo unos pocos terminaríamos haciendo una tesis doctoral? Y mirad dónde estamos ahora, pues prácticamente todos recorreremos este camino, a mayor o menor distancia unos de los otros, pero igualmente juntos. Gracias por formar una piña, por escucharme y aconsejarme en los momentos de mayor estrés y por estar ahí a pesar de no vernos con tanta frecuencia.

Gracias a todos los que han ido aportando granitos y montañas de arena durante estos años. A Alfonso, Laura, María, Rosa y José, por darme fuerzas cuando intentaba multiplicarme por tres

en un mismo año. A “las niñas del baile”, por los ratitos de despeje y relajación bailando salsa. Y, por supuesto, a mis amigos de diario, por comprender mis ausencias, y celebrar los éxitos como si fueran suyos.

Finalmente, quiero dirigir mi más profundo agradecimiento a mi familia, comenzando por mis padres. Gracias por inculcarme desde siempre que el trabajo y el esfuerzo constante son el único camino para alcanzar metas, porque me habéis hecho ganadora de mi propia vida, de la que no puedo estar más feliz. Gracias por los valores transmitidos en la educación que me habéis regalado, enseñándome a labrarme mi propio futuro, a ser responsable y a seguir subiendo peldaños en mi vida. Habéis madrugado conmigo, trasnochado conmigo, os habéis preocupado conmigo, anteponiendo mis intereses a los vuestros, envolviéndome en un abrazo infinito que me daba fuerzas para seguir adelante. Gracias por confiar ciegamente en mí, sin importar los tropiezos y las dudas, aconsejándome y ayudándome a resolver todos los problemas, por imposibles que fueran. Nada es imposible si os tengo a mi lado, y, aunque sigo siendo “la chiquinina”, me habéis hecho y me seguís haciendo grande. Os quiero mucho a los dos.

Especialmente, agradecer a la persona que más quiero en mi vida, mi hermana Laura, mi tata. Mi hermana ha sido, y sigue siendo, mi primer modelo a seguir, porque la admiración que siento por ella ya viene desde hace muchos años, concretamente 26, mi edad, y continúa creciendo sin límite. Mi hermana ha sido y es mi segunda piel, porque ha sabido comprender cada detalle en mis experiencias de vida, advirtiéndome, aconsejándome, animándome, y ayudándome en cada paso que he dado. Gracias tata por tu ejemplo, porque has sido mi mayor motivación. Gracias por ser mi amiga, por ser mi apoyo, por transmitirme tu coraje y esfuerzo, y, sobre todo, por tu infinita paciencia. Es la ciencia la que se maravilla contigo, por tu talento, tu mente innovadora y la grandeza que te caracteriza. Eres la mejor hermana, mi tata, caminando siempre con el corazón en la mano. Gracias por ser mi hermana, por tus abrazos hasta en la distancia y porque “la complicidad es tanta, que nuestras vibraciones se complementan. Lo que tienes me hace falta, y

lo que tengo te hace ser más completa”. Gracias por completar mi vida y llenarla de esa alegría con la que todos me definen, pero que, sin ti, no sería tan grande. Te quiero mucho tata.

Gracias también al resto de mi familia, por su amor y su cariño, sus abrazos y su apoyo incondicional. Vosotros, mi familia, sois mis mejores amigos, los que nunca fallan y siempre perdonan. Me siento tan orgullosa de esta familia, que es para mi un orgullo dedicarle este trabajo, porque sin ellos nada de esto habría sido posible. En especial, gracias a ti Cascarilla. Eres mi salvavidas, mi confidente para aquello que no me apetece confiar a nadie más. Eres, más que mi primo, mi hermano. Gracias por haberme querido tanto, por haber compartido tanto conmigo, y por enseñarme la vida desde otros ojos en los que hay que exprimir cada segundo. Gracias por hacerme saber que estás siempre conmigo, en cada bocanada de aire de buenas noches. Te quiero infinitamente.

Gracias también a Socra, que ha recorrido, prácticamente desde el inicio de mi tesis doctoral, este camino junto a mí. Gracias por estar siempre a mi lado, por los ánimos en los momentos de bajón, por la celebración de mis éxitos, y, sobre todo, por la comprensión y la seguridad que me has aportado, enseñándome que la felicidad está, como diría Antonio Machado, en el camino que se hace al andar.

Gracias a todos y todas porque, de un modo u otro, me habéis ayudado a llegar hasta aquí.

*“En algún lugar, algo increíble está
esperando ser conocido”*

Carl Sagan

A mis padres

A mi tata

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	30
INDICE DE TABLAS	38
RESUMEN	42
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	50
1. INTRODUCCIÓN.....	60
1.1. El hígado y la enfermedad hepática.....	60
1.2. Hepatitis C como enfermedad hepática.....	60
1.2.1. Estructura del virus de la Hepatitis C.....	61
1.2.2. Variabilidad genética del virus de la Hepatitis C y sus implicaciones.....	63
1.2.3. Ciclo de replicación del virus de la Hepatitis C.....	65
1.2.4. Sistema de infección <i>in vitro</i>	68
1.3. Enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA)	69
1.3.1. EHGNA y metabolismo lipídico.....	70
1.3.2. EHGNA, estrés oxidativo y lipotoxicidad.....	71
1.3.3. EHGNA, inflamación e inflammasoma	72
1.3.4. EHGNA y fibrosis hepática.....	74
1.4. Tratamientos actuales en la enfermedad hepática	76
1.4.1. Tratamientos actuales frente a la hepatitis C	76
1.4.2. Tratamientos actuales frente a la EHGNA y fibrosis hepática	79
1.5. Tratamientos naturales con extractos de hongos	82

1.5.1.	Tratamientos naturales en la Hepatitis C.....	82
1.5.2.	Tratamientos naturales en la EHGNA y fibrosis hepática.....	85
1.5.3.	<i>Agaricus bisporus</i> y sus propiedades terapéuticas.....	86
2.	OBJETIVOS.....	90
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	94
3.1.	Reactivos.....	94
3.2.	Preparación y caracterización de extractos de champiñones	97
3.2.1.	Preparación del extracto de <i>Agaricus bisporus</i> (AbAEE)	97
3.2.2.	Fraccionamiento del extracto crudo AbAEE para ensayo <i>in vitro</i> NS3/4A del VHC	99
3.2.3.	Análisis químico de las diferentes fracciones de AbAEE	100
3.3.	Líneas celulares y técnicas de cultivo celular	101
3.3.1.	Línea celular de hepatoma humano Huh7.5	101
3.3.2.	Línea celular estrellada hepática LX2.....	101
3.3.3.	Generalidades para el cultivo celular	101
3.3.4.	Descongelación de células.....	102
3.3.5.	Preparación de la línea celular para su uso.....	102
3.3.6.	Conteo celular.....	103
3.4.	Infección de células Huh7.5 por VHC. Producción de partículas virales	104
3.5.	Tratamiento de líneas celulares con extractos de <i>Agaricus bisporus</i>	105
3.5.1.	Ensayos para determinar los efectos citotóxicos del extracto de <i>Agaricus bisporus</i> en células	105
3.5.2.	Tratamiento de Huh7.5 con extractos de <i>Agaricus bisporus</i> y quercetina	105

3.5.3.	Tratamiento de células LX2 con extractos de <i>Agaricus bisporus</i>	105
3.6.	Modelos animales	106
3.6.1.	Ensayos para determinar los efectos citotóxicos del extracto de <i>Agaricus bisporus</i> en animales	106
3.6.2.	Modelo animal KO LDLr.....	108
3.6.3.	Modelo animal KO NLRP3.....	110
3.7.	Ensayo fluorimétrico proteasa NS3/4A del virus de Hepatitis C.....	111
3.8.	Extracción de ADN total con TRISURE™	113
3.8.1.	Extracción de ADN de homogenado celular de Huh7.5 infectadas con VHC y de LX2.	113
3.8.2.	Extracción de ADN de homogenado tisular hepático de ratones KO LDLr	114
3.9.	Transcripción inversa	114
3.10.	Extracción de proteínas.....	115
3.10.1.	Extracción de proteínas de homogenado celular de Huh7.5 infectadas con VHC y de LX2	115
3.10.2.	Extracción de proteínas de homogenado tisular hepática de ratones KO NLRP3	115
3.11.	Análisis de expresión génica en células LX2 y tejidos hepáticos: PCR ...	116
3.12.	Determinación de los niveles de ARN y proteínas del VHC en células Huh7.5 infectadas con VHC	117
3.13.	Análisis de expresión proteica en células Huh7.5 infectadas con VHC, células LX2 y tejidos hepáticos: WESTERN-BLOT.....	117
3.14.	Evaluación histológica del hígado.....	119
3.15.	Análisis de actividad SOD.....	120

3.16. Análisis estadístico.....	121
4. RESULTADOS.....	124
4.1. EXTRACTOS NATURALES DE CHAMPIÑONES (<i>AGARICUS BISPORUS</i>) SIN EFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS Y ANIMALES.	124
4.2. EXTRACTOS NATURALES DE CHAMPIÑONES (<i>AGARICUS BISPORUS</i>) COMO INHIBIDORES DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.	127
4.2.1. Fracciones de bajo peso molecular <i>AbAEE</i> inhiben a la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C.....	127
4.2.2. Fracciones solubles <i>AbAEE</i> inhiben a la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C...	128
4.2.3. El extracto <i>AbAEE</i> presenta capacidad de inhibición de diferentes genotipos de proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C.....	130
4.2.4. El extracto <i>AbAEE</i> impide la replicación viral del virus de la hepatitis C.....	132
4.2.5. Caracterización química del extracto <i>AbAEE</i>	135
4.3. EXTRACTOS NATURALES DE CHAMPIÑONES (<i>AGARICUS BISPORUS</i>) COMO MODULADORES DE LA FIBROSIS, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN HEPÁTICA IN VITRO Y EN UN MODELO ANIMAL DE EHGNA.	139
4.3.1. El tratamiento de células LX2 con extractos de <i>AbAEE</i> reducen los niveles de marcadores fibróticos y estrés oxidativo e incrementan los niveles del factor protector GATA4.	139
4.3.2. Los extractos <i>AbAEE</i> regulan el peso corporal de los ratones EHGNA alimentados con dieta alta en grasa.....	143
4.3.3. Los extractos <i>AbAEE</i> reducen los niveles génicos de marcadores fibróticos y de estrés oxidativo en ratones EHGNA.	145

4.3.4. Los extractos <i>AbAEE</i> reducen la fibrosis e inflamación hepática en ratones EHGNA alimentados con dieta alta en grasa.	147
4.4. EL COMPLEJO NLRP3 INFLAMASOMA COMO DIANA CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LA ENFERMEDAD EHGNA: FIBROSIS, METABOLISMO LIPÍDICO Y ESTRÉS OXIDATIVO.	151
4.4.1. La ausencia del complejo NLRP3 inflamasoma no afecta al peso corporal de los ratones, pero reduce los niveles de colesterol en sangre	151
4.4.2. La ausencia del complejo NLRP3 inflamasoma mejora los niveles de marcadores de metabolismo lipídico en ratones KO NLRP3	153
4.4.3. La ausencia del complejo NLRP3 inflamasoma mejora los niveles de marcadores de estrés oxidativo en ratones KO NLRP3	156
4.4.4. La ausencia del complejo NLRP3 inflamasoma mejora los niveles de marcadores fibróticos en ratones KO NLRP3	158
161	
5. DISCUSIÓN	166
6. CONCLUSIONES	190
7. BIBLIOGRAFÍA	194
8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	218
9. APORTACIONES A CONGRESOS	222
ANEXOS (ARTÍCULOS)	226

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura virus de la Hepatitis C (VHC). (Pág 61)

Figura 2. Organización genómica y proteica del virus de la Hepatitis C (VHC). (Pág 63)

Figura 3 Distribución geográfica de los genotipos del virus de la Hepatitis C (VHC). (Pág 65)

Figura 4. Estructura de una lipoviripartícula (LVP). (Pág 66)

Figura 5. Esquema del proceso de ensamblaje del virus de la Hepatitis C (VHC) en forma de lipoviripartícula a los hepatocitos. (Pág 67)

Figura 6. Esquema del proceso de liberación, maduración y salida del virus de la Hepatitis C (VHC) en forma de lipoviripartícula en los hepatocitos. (Pág 68)

Figura 7. Esquema del espectro histológico de la enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA), desde un hígado sano hasta el desarrollo de un carcinoma hepatocelular. (Pág 70)

Figura 8. Esquema relacional entre la enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA), fibrosis hepática e inflammasoma. (Pág 73-74)

Figura 9. Activación de las CEH desde un estado inactivo. (Pág 75)

Figura 10. Tratamientos actuales frente a la enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA) y la fibrosis hepática (Pág 82)

Figura 11. Esquema del proceso de preparación de los extractos *AbAEE*. (Pág 98)

Figura 12. Esquema del funcionamiento del kit fluorimétrico AnaSpec® de la actividad proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (VHC). (Pág 112)

Figura 13. Inhibición de la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (VHC) (genotipo 1b) por fracciones de *AbAEE* obtenidas por ultrafiltración. (Pág 128)

Figura 14. Inhibición de la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (VHC) (genotipo 1b) por fracciones de *AbAEE* obtenidas por extracción líquido-líquido (ELL) secuencial. **(Pág 130)**

Figura 15. Inhibición de la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (VHC) (genotipo 2a) por fracciones de *AbAEE* obtenidas por ultrafiltración y extracción líquido-líquido (ELL) secuencial. **(Pág 131)**

Figura 16. Inhibición de la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (VHC) (genotipo 3a) por fracciones de *AbAEE* obtenidas por ultrafiltración y extracción líquido-líquido (ELL) secuencial. **(Pág 132)**

Figura 17. Niveles de ARN intracelular de cadena negativa del virus de la Hepatitis C (VHC) (%) en células Huh7.5 infectadas con JFH1 del VHC (genotipo 2a) tratadas con quercetina y *AbAEE*. **(Pág 133)**

Figura 18. Niveles de ARN extracelular del virus de la Hepatitis C (VHC) (%) en células Huh7.5 infectadas con JFH1 del VHC (genotipo 2a) tratadas con quercetina y *AbAEE*. **(Pág 134)**

Figura 19. Expresión proteica de la proteasa NS3 y del núcleo (core) del virus de la Hepatitis C (VHC) en células Huh7.5 infectadas con JFH1 del VHC (genotipo 2a) tratadas con quercetina y *AbAEE*. **(Pág 135)**

Figura 20. Niveles de expresión génica y proteica del marcador fibrótico COL-1 α -1 en células LX2 tratadas con *AbAEE* durante 24 horas. **(Pág 140)**

Figura 21. Niveles de expresión génica de los marcadores fibróticos *Tpm2 β* y *Acta-2 α* en células LX2 tratadas con *AbAEE* durante 24 horas. **(Pág 140)**

Figura 22. Niveles de expresión génica y proteica del marcador fibrótico GATA4 en células LX2 tratadas con *AbAEE* durante 24 horas. **(Pág 141)**

Figura 23. Niveles de expresión génica del marcador de estrés oxidativo *Sod2* en células LX2 tratadas con AbAEE durante 24 horas. (Pág 142)

Figura 24. Niveles de expresión génica del marcador de estrés oxidativo *Nos2* en células LX2 tratadas con AbAEE durante 24 horas. (Pág 143)

Figura 25. Peso corporal y parámetros bioquímicos en sangre (niveles de glucosa y niveles de GOT/AST) en ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) durante 12 semanas de intervención nutricional con AbAEE. (Pág 145)

Figura 26. Niveles de expresión génica de marcadores de fibrosis fibróticas COL-1 α -1 y GATA4 en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) tras 12 semanas de intervención nutricional con AbAEE. (Pág 146)

Figura 27. Niveles de expresión génica de marcadores de estrés oxidativo *Sod2* y *Nos2* en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) tras 12 semanas de intervención nutricional con AbAEE. (Pág 147)

Figura 28. Análisis histológico del daño en el hígado inducidos por una dieta alta en grasa (HFD, del inglés *High Fat Diet*) en ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) y cuantificación de fibras de colágeno y células positivas para GATA4 tras un período de 12 semanas de intervención nutricional con AbAEE. (Pág 148)

Figura 29. Análisis de la inflamación inducida por una dieta alta en grasa (HFD, del inglés *High Fat Diet*) en ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) y cuantificación de células positivas para MOMA-2 tras un período de 12 semanas de intervención nutricional con AbAEE. (Pág 149-150)

Figura 30. Peso corporal, ingesta de alimentos y parámetros bioquímicos (niveles de glucosa y colesterol) en ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) durante 20 meses. **(Pág 153)**

Figura 31. Niveles de expresión proteica del marcador de metabolismo lipídico MTP en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 154)**

Figura 32. Niveles de expresión proteica del marcador de metabolismo lipídico FASN en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 155)**

Figura 33. Niveles de expresión proteica del marcador de metabolismo lipídico DGAT1 en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 156)**

Figura 34. Niveles de actividad SOD en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 157)**

Figura 35. Niveles de expresión proteica del marcador de estrés oxidativo PTPRG en muestras de hígados de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 158)**

Figura 36. Análisis histológico del daño en el hígado en ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y ratones control (WT, del inglés *wild type*). Tinción tricrómica de Masson y aspecto de hígados de ratones. **(Pág 159)**

Figura 37. Niveles de expresión proteica del marcador fibrótico COL-1 α -1 en muestras de hígados de ratones ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3*^{-/-}) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 160)**

Figura 38. Niveles de expresión proteica del marcador fibrótico TPM2 β en muestras de hígados de ratones ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3*^{-/-}) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 161)**

Figura 39. Niveles de expresión proteica del marcador fibrótico GATA4 en muestras de hígados de ratones ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3*^{-/-}) y ratones control (WT, del inglés *wild type*) tras un período de 20 meses. **(Pág 162)**

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos actuales frente a la Hepatitis C. (Pág 78)

Tabla 2. Anticuerpos para medición de expresión proteica usados en el estudio. (Pág 94)

Tabla 3. Cebadores para medición de expresión génica usados en el estudio. (Pág 95)

Tabla 4. Kits y reactivos utilizados para los diferentes experimentos desarrollados en el estudio. (Pág 96-97)

Tabla 5. Resultado del procesamiento de *Agaricus bisporus* (Pág 99)

Tabla 6. Distribución de los grupos de ratas controles y tratados con AbAEE por sexo y dosis del extracto para el estudio preliminar de toxicidad de AbAEE. (Pág 107)

Tabla 7. Composición de macronutrientes de las dietas experimentales de los ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) . (Pág 109)

Tabla 8. Viabilidad y toxicidad en células Huh7.5 usando diferentes concentraciones de AbAEE. (Pág 124)

Tabla 9. Viabilidad y toxicidad en células LX2 usando diferentes concentraciones de AbAEE. (Pág 125)

Tabla 10. Toxicidad aguda (estudio preliminar de toxicidad) en ratas tratadas con dosis de 5000 mg/kg de AbAEE. (Pág 126)

Tabla 11. Lista de metabolitos identificados por LC/MS-QTOF en las diferentes fracciones de AbAEE: fracciones UF-3kDa, AcF-3kDa y fracciones orgánicas HF-3kDa, DCM-3kDa y EAF-3kDa agrupadas obtenidas por extracción líquido-líquido (ELL) secuencial. (Pág 137-138)

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

La enfermedad hepática, cuya etiología es diversa, suele producirse como respuesta a una lesión hepatocelular crónica provocada, mayoritariamente, por el abuso de bebidas alcohólicas, aunque existen otras causas importantes que van a ser el grueso de este trabajo, como las infecciones crónicas producidas por el virus de la hepatitis C (VHC) o las enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (SM), como la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA). Tanto la infección por virus como la dieta alta en grasas provocan daños crónicos lipotóxicos, de estrés oxidativo e inflamación hepática que activan a células estrelladas hepáticas, iniciándose un proceso de fibrosis, cirrosis y finalmente, hepatocarcinoma. Estos daños se agravan con la activación inapropiada del complejo inflammasoma NLRP3, y a su vez, pueden retroalimentar la activación de este complejo. Asimismo, la infección por VHC se considera el catalizador primario para la disfunción hepática y activación del inflammasoma NLRP3, por lo que la regulación de cualquiera de estas vías podría evitar la progresión de las enfermedades del hígado.

Existen diversos tratamientos para la infección por el virus de la hepatitis C, los cuales presentan una gran potencia y una alta eficacia de inhibición de proteínas virales implicadas en la replicación, como la proteasa NS3/4A, la ARN polimerasa NS5B y la NS5A. Desde los primeros fármacos para el tratamiento de la hepatitis, como IFN- α y ribavirina o inhibidores de la proteasa NS3, como telaprevir o boceprevir, las terapias para la infección han avanzado hasta llegar al sofosbuvir. El sofosbuvir, inhibidor de la ARN polimerasa del VHC, es uno de los antivirales de acción directa (AAD) con mejores resultados en pacientes con hepatitis C, actuando solo o en combinación con otros. Entre ellos se encuentran antagonistas de la NS5A como daclatasvir, ledipasvir o elbasvir, inhibidores de la proteasa NS3/4A como glecaprevir y grazoprevir o inhibidores de la NS5B, como dasabuvir. A pesar de los resultados positivos que presentan estos fármacos, la resistencia desarrollada por el virus, sumado a que en algunos países el precio aún es

elevado, hace necesaria la búsqueda de alternativas más accesibles ante la consolidación de un proyecto mundial para la eliminación total de la hepatitis C. En cuanto a la fibrosis hepática y la EHGNA, el tratamiento se ha basado en frenar los agentes que las causan o agravan, como la resistencia a insulina mediante tiazolidinedionas o el estrés oxidativo mediante vitamina E. Los inhibidores de receptores de hormonas, como el ácido obeticolico o el cilofexor, mejoran la esteatosis hepática, mientras que los agonistas de receptores PPAR, como elafibranor, actúan regulando el metabolismo lipídico y la inflamación. La mayoría de estos fármacos aún se encuentran en fase de ensayos clínicos, necesitando una investigación más profunda para el desarrollo de tratamientos más específicos frente al proceso fibrogénico derivado de la EHGNA.

Es por ello por lo que surge una necesidad en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Recientemente ha surgido un interés en productos de origen natural como tratamientos frente a este tipo de enfermedades, destacando el uso de hongos ricos en compuestos bioactivos antioxidantes y antiinflamatorios. Entre las distintas especies de hongos, el champiñón común (*Agaricus bisporus*) y la seta de ostra (*Pleurotus ostreatus*) son una fuente primaria de ergotioneina (ET), un potente antioxidante, además de presentar compuestos, como los β -glucanos, con un papel en la activación del sistema inmune, sumado a su alto contenido en fibra, que facilita la reducción del colesterol y disminución de niveles de ácidos grasos. Estas características los sitúan en la línea de investigación de nuevos tratamientos frente a las enfermedades hepáticas descritas, asegurando así un menor coste, una mayor accesibilidad y una reducción de efectos secundarios al ser un tratamiento natural.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la afectación hepática desde diversas etiologías, como la infección por VHC y la EHGNA, haciendo énfasis en la progresión de la fibrosis hepática, con el fin último de la búsqueda de nuevos tratamientos selectivos, preventivos

y naturales basados en extractos de champiñones (*Agaricus bisporus*). Para ello se han abordado los siguientes subobjetivos:

1. Evaluar la capacidad inhibitoria que presentan los extractos naturales de *Agaricus bisporus* frente a la proteasa NS3/4A del VHC mediante un análisis fluorimétrico de actividad proteasa.
2. Evaluar el efecto antifibrótico, antioxidante y antiinflamatorio que presentan los extractos naturales de *Agaricus bisporus* en células estrelladas hepáticas LX2 y en un modelo animal de ratón *LDLr^{-/-}* con dieta rica en grasa (modelo de EHGNA), mediante el empleo de marcadores moleculares (génico y proteico)
3. Evaluar el complejo NLRP3 inflamasoma como diana clave en la regulación del metabolismo lipídico, actividad fibrótica y de estrés oxidativo en un modelo animal de ratón *NLRP3^{-/-}*, mediante el empleo de marcadores moleculares (proteico).

Materiales y métodos

La variedad del hongo *Agaricus bisporus* fue cultivada de acuerdo con los procedimientos estándar. Los extractos enzimáticos acuosos de *Agaricus bisporus* (del inglés, *Agaricus bisporus Aqueous Enzymatic Extract*, AbAEE) se prepararon a partir de los cuerpos fructíferos, mediante una homogeneización, tratamiento enzimático y filtración por filtros de tamaño de poro de 0,22 µm. Los extractos AbAEE fueron fraccionados por peso molecular usando membranas de ultrafiltración de distintos tamaños: 100 kDa, 20 kDa y 3 kDa, obteniendo los ultrafiltrados de 100 kDa (UF-100), 20 kDa (UF-20) y 3 kDa (UF-3). El extracto UF-3 se fraccionó utilizando extracción líquido-líquido (ELL) secuencial usando disolventes con distinto índice de polaridad: agua (fracción acuosa AcF-3kDa), acetato de etilo (fracción AEF-3kDa), diclorometano (fracción DMF-3kDa) y hexano (fracción HF-3kDa). La composición de las diferentes fracciones se analizó mediante cromatografía líquida (CL) acoplada a un espectrómetro de masas (EM). Las diferentes

fracciones se utilizaron en un ensayo *in vitro* fluorimétrico de la actividad proteasa NS3/4A del VHC (kit SensoLyte® 520 HCV) para la cuantificación continua de la actividad de dicha proteasa NS3/4A (genotipos 1b, 2a y 3a) del VHC, y la detección de los posibles inhibidores presente en los extractos.

Las líneas celulares Huh7.5 de hepatoma celular fueron infectadas con la cepa JFH1 y tratadas con AbAEE, a tiempos de 72 horas, para evaluar la capacidad de inhibición de replicación viral de los extractos ($n=5$). Se midieron los niveles intracelulares de ácido ribonucleico (ARN) del VHC de cadena negativa mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés, *Real Time-quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR), además de cuantificarse los niveles de ARN extracelulares del VHC usando un kit comercial de ensayos de carga viral (Roche COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0). La expresión proteica de partículas virales se realizó mediante Western Blot, analizándose la expresión del núcleo (core) del VHC y de la proteasa NS3/4A.

La línea celular estrellada hepática (LX2) se trató con distintas concentraciones (1 mg/mL y 0,2 mg/mL) de extracto AbAEE a tiempo de 24 horas ($n=5$). Se realizó una extracción de ARN con TRIsure, retrotranscripción y un análisis de expresión de distintos marcadores de fibrosis (*Col-1 α -1*, *Acta-2 α* , *Tpm2 β* , *Gata4*), estrés oxidativo (*Sod2*), inflamación (*Nos2*) mediante RT-qPCR. La extracción de proteínas sirvió para el análisis proteico por Western Blot de los marcadores COL-1 α -1 y GATA4. Los ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) ($n=20$), se dividieron en 4 grupos: dos grupos fueron alimentados con una dieta estándar baja en grasa sin extracto de *Agaricus bisporus* (LFD, del inglés *Low Fat Diet*) y con extracto de *Agaricus bisporus* (LFD+AB) y dos grupos fueron alimentados con una dieta alta en grasa sin extracto de *Agaricus bisporus* (HFD, del inglés *High Fat Diet*) y con extracto de *Agaricus bisporus* en la dieta (HFD+AB). Los animales se mantuvieron durante 12 semanas en el régimen descrito. Los hígados fueron extirpados y recolectados para los diferentes análisis. Se analizaron los niveles de

transaminasas, marcadores de fibrosis (GATA4 y COL-1 α -1), de inflamación (MOMA-2) y estrés oxidativo (SOD2 y NOS2).

Los ratones KO NLPR3 (*NLRP3*^{-/-}) y sus respectivos controles ($n=4$) se mantuvieron con acceso *ad libitum* a dieta estándar y agua, controlando semanalmente peso corporal y la ingesta durante 20 meses. Los hígados fueron extirpados y recolectados para los diferentes análisis. Se analizaron los niveles proteicos de marcadores de metabolismo lipídico (MTP, FASN, DGAT1), de estrés oxidativo (PTPRG) y fibróticos (COL-1 α -1, TPM2 β , GATA4). Se analizó la actividad SOD para medir los niveles de estrés oxidativo en los ratones.

Resultados

Los resultados obtenidos han podido confirmar, por un lado, que los extractos de *A. bisporus* bloquean la replicación del VHC por medio de la inhibición de la proteasa NS3/4A de diferentes genotipos del virus (1b, 2a y 3a). La caracterización de los extractos demuestra que las fracciones de bajo peso molecular y de carácter polar (AcF-3 kDa) presentan los mayores niveles de inhibición de la proteasa NS3/4A (genotipo 1b), llegando a un 87,73 \pm 6,0 % ($p\leq 0,001$), en comparación con otras fracciones de mayor peso molecular y de aquellas de 3 kDa de carácter más apolar. En un ensayo en células Huh7.5 infectadas con el VHC, las fracciones UF-3kDa del *AbAEE* disminuyeron significativamente los niveles de ARN intracelular del VHC en un 93,3 \pm 0,21 % ($p\leq 0,001$), en relación con células control tratadas con interferón α . En cuanto a la producción extracelular de las partículas virales, las fracciones UF-3kDa disminuyeron la carga viral en un 33,6 \pm 3,1 % ($p\leq 0,004$), además de inhibir la síntesis de proteínas del núcleo del VHC (0,08 \pm 0,04) y de la proteasa NS3/4A (0,02 \pm 0,02). Estos resultados obtenidos para el genotipo 1b se confirmaron en los genotipos 2a y 3a del VHC. La caracterización de los extractos ha señalado como inhibidores de la proteasa NS3/4A del VHC a fracciones orgánicas de bajo peso molecular (AqF-3 kDa), destacando el antioxidante ergotioneína.

Los extractos de *A. bisporus*, a su vez, son moduladores de la fibrosis, estrés oxidativo e inflamación hepática derivada de la enfermedad hepática por dieta alta en grasa, la EHGNA. Los extractos de *A. bisporus* redujeron significativamente los marcadores de fibrosis (COL-1 α -1, ACTA-2 α , TPM2 β), estrés oxidativo (SOD2) e inflamación (NOS2, MOMA-2) e incrementaron los niveles del factor protector GATA4, tanto en células LX2 como en un modelo animal de EHGNA (KO LDLr).

Se piensa que estos extractos actúan a través de la regulación de las vías inflamatorias. Es por ello por lo que, en un modelo animal KO del complejo NLRP3 inflamasoma, se observó cómo marcadores fibróticos (COL-1 α -1, TPM2 β), de metabolismo lipídico (MTP, FASN y DGAT1) y de estrés oxidativo (PTPRG, SOD2) se reducían en comparación a los controles, confirmando esta hipótesis.

Conclusiones

Nuestra hipótesis partía de que la activación de las vías de señalización del proceso inflamatorio puede permitir la progresión de la fibrosis hepática. Este proceso inflamatorio puede desencadenarse o bien por una infección por VHC o bien por un exceso lipídico por dieta alta en grasa, que provoque daños lipotóxicos, estrés oxidativo e inflamación, procesos cuya regulación prevendrían la progresión de la enfermedad. Los resultados confirman que los extractos de *A. bisporus* atenúan el daño hepático en células LX2 y en un modelo animal por dieta alta en grasa, efecto protector mediado por la regulación de las vías de inflamación y estrés oxidativo. Asimismo, son inhibidores de la replicación del VHC, una de las causas principales de la enfermedad hepática. Por tanto, proponemos el uso de extractos concentrados derivados de *Agaricus bisporus* como alternativa no tóxica, económica y preventiva frente a la infección por VHC y al desarrollo de la fibrosis enmarcada dentro de la EHGNA.

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%: Tanto por ciento

$\lambda_{\text{exc/em}}$: Longitud de onda de excitación/emisión

A

- **AbAEE:** Extractos enzimáticos acuosos de *Agaricus bisporus* (del inglés, *Agaricus bisporus Aqueous Enzymatic Extract*)
- **ACC:** acetil-CoA carboxilasa
- **AcF:** Fracción de AbAEE acuosa 3 kDa
- **AAD:** Antivirales de acción directa
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AEF-3kDa:** Fracción de AbAEE en acetato de etilo 3 kDa
- **AGs:** Ácidos grasos
- **AL:** agua de lavado
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ASC:** del inglés *Apoptosis-associated Speck-like Protein*
- **TA:** Toxicidad aguda

B:

- **BPV:** Boceprevir

C:

- **C:** Core o núcleo
- **CCl₄:** Tetracloruro de carbono
- **CEH:** Células estrelladas hepáticas
- **CHC:** Carcinoma hepatocellular

- **ChREBP:** Proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos (del inglés, *Carbohydrate-response element-binding protein*)
- **CL:** cromatografía líquida
- **CM:** Características moleculares
- **cm²:** centímetro cuadrado
- **CO₂:** Dióxido de carbono
- **Ct:** Valor del ciclo umbral
- **DMF-3kDa:** Fracción de AbAEE en diclorometano 3 kDa

D:

- **DEPC:** dietilpirocarbonato
- **DGAT:** Diacilglicerol aciltransferasa
- **DMEM:** del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DMN:** dimetilnitrosamina
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **DTT:** Ditioneitol

E:

- **E:** Enzima
- **EDTA:** Ácido etilendiamiltetracético
- **EHGNA:** Enfermedad de hígado graso no alcohólica
- **EHNA:** Esteatohepatitis no alcohólica
- **ENA:** Esteatosis no alcohólica
- **eIF:** Factor de iniciación eucariota (del inglés, *eukaryotic initiation factor*)
- **ELL:** Extracción líquido-líquido
- **EM:** Espectrómetro de masas

- **EROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **ET:** Ergotioneina
- **EtOH:** etanol

F:

- **FAS:** Ácido graso sintasa (del inglés *Fatty Acid Synthase*)
- **FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés *Food and Drug Administration*)

G:

- **g:** Fuerza centrífuga relativa
- **g:** Gramo
- **GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

H:

- **H₂O_d:** Agua destilada
- **HCl:** Cloruro sódico
- **HDL:** Lipoproteína de alta densidad (del inglés *High density lipoprotein*)
- **HF-3kDa:** Fracción de AbAEE en hexano 3 kDa
- **HFD/HFD+AB:** Dieta alta en grasa (del inglés *High Fat Diet*) sin extracto de *Agaricus bisporus* / con extracto de *Agaricus bisporus*
- **HRP:** peroxidasa del rábano picante (del inglés, *horseradish peroxidase*)
- **HSPs:** Proteínas de shock térmico (del inglés, *Heat shock proteins*)
- **HSPGs:** proteoglicanos heparán sulfato (del inglés *heparan sulfate proteoglycans*)
- **Huh7.5:** Línea celular de hepatoblastoma derivada de Huh7
- **Huh7:** Línea celular de hepatoblastoma

- **HVR:** Región hipervariable (del inglés, *hypervariable region*)

I:

- **IFN:** Interferón
- **IL:** interleuquina
- **iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *inducible nitric oxide synthase*)
- **Ip:** Índice de polaridad
- **IRES:** Región interna de entrada al lugar ribosomal (del inglés *Internal Ribosome Entry Sites*)
- **ISDR:** Región determinante de la sensibilidad al interferón (del inglés, *interferon sensitivity determining region*)

J:

- **JAK-STAT:** *Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*
- **JFH-1:** Hepatitis japonesa fulminante (del inglés, *Japanese fulminant hepatitis*)

K:

- **Kb:** Kilobase
- **KCl:** Cloruro de potasio
- **kDa:** Kilodalton
- **KO:** Knock-out

L:

- **LC-MS:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (del inglés *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)
- **LDL:** Lipoproteína de baja densidad (del inglés, *Low density lipoprotein*)

- **LDLr:** receptor LDL
- **LDs:** Gotas lipídicas (del inglés, *lipid droplets*)
- **LFD/LFD+AB:** Dieta baja en grasa (del inglés, *Low Fat Diet*) con extracto de *Agaricus bisporus*/ sin extracto de *Agaricus bisporus*
- **LVP:** Lipoviropartícula
- **LX2:** Línea Celular estrellada hepática

M:

- **MEC:** matriz extracelular
- **Met-ARNt:** Metionil-ARN transferente
- **mg:** Miligramo
- **mL:** Mililitro
- **mM:** Milimolar
- **MMP:** Metaloproteinasas
- **MOI:** multiplicidad de infección (del inglés, *multiplicity of infection*)
- **MTTP:** Proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (del inglés, *Microsomal Trygliceride Transfer Protein*)
- **µg:** Microgramo

N:

- **NaOH:** Hidróxido sódico
- **ng:** Nanogramo
- **NLR:** Receptores de tipo NOD
- **nm:** Nanómetro
- **nM:** Nanomolar

O:

- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **oxLDL:** partículas de LDL oxidadas

P:

- **PBS:** del inglés, *Phosphate-buffered saline*
- **PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, *platelet derived growth factor*)
- **PRR:** Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, *Pattern Recognition Receptor*)
- **PTPRG:** Receptor de la proteína tirosina fosfatasa tipo G (del inglés, *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type G*)

R:

- **RBV:** Ribavirina
- **RE:** Retículo endoplasmático
- **RI:** Resistencia a insulina
- **RIG-I:** Gen I inducible de ácido retinoico citosólico
- **RNAsa:** Ribonucleasa
- **RT:** Retrotranscripción
- **RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real del inglés *Real Time-quantitative polymerase chain reaction*

S:

- **S:** Sustrato
- **SFB:** Suero fetal bovino

- **SM:** Síndrome Metabólico
- **SOD:** Superóxido dismutasa
- **SRB1:** Receptor scavenger tipo I clase B (del inglés, *Scavenger Receptor class B type 1*)
- **SREBP-1c:** Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (del inglés, *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*)

T:

- **TGF- β 1:** Factor transformador de crecimiento β 1 (del inglés, *Transforming growth factor β 1*)
- **TGs:** Triacilglicéridos
- **TIMP:** Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (del inglés, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*)
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor Alpha*)
- **TPM:** Tropomiosina
- **TPV:** Telaprevir
- **Tris:** Tris (hidroximetil) aminometano
- **TRIsure:** Tiocianato de guanidina

U:

- **U/mL:** Unidades por mililitro
- **U/ μ L:** Unidades por microlitro
- **UF:** Ultrafiltrado

V:

- **VHC:** Virus de la hepatitis C
- **VLDL:** Lipoproteína de muy baja densidad (del inglés, *Very low density lipoprotein*)

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El hígado y la enfermedad hepática

Las enfermedades del hígado, cuya etiología es diversa, suelen producirse como respuesta a una lesión hepatocelular crónica provocada mayoritariamente por el abuso de bebidas alcohólicas, por infecciones crónicas como las producidas por el virus de la hepatitis C, por enfermedades biliares o por aquellas relacionadas con el síndrome metabólico, como la enfermedad de hígado graso no alcohólica o la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) ¹.

1.2. Hepatitis C como enfermedad hepática

La hepatitis C es una enfermedad provocada por el virus C de la familia *Flaviviridae*, y actualmente se está convirtiendo en uno de los problemas de salud pública más graves en la actualidad. Según datos recientes (9 de julio del año 2019) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen en torno a 71 millones de personas infectadas en todo el mundo, de los cuales alrededor de 399.000 mueren anualmente, ya que el acceso al diagnóstico y tratamiento antivírico es muy limitado.

La enfermedad de la hepatitis ya fue descrita en 1970 por Bianchi como un proceso inflamatorio del hígado ². El origen etiológico puede ser diverso, pudiendo desarrollarse tras la exposición a diferentes tóxicos como agentes químicos, debida a alteraciones en el sistema inmune, pudiendo derivar de una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) o teniendo un origen infeccioso por virus, bacterias o parásitos. Sin embargo, la principal causa de la enfermedad es la infección provocada por el virus de la hepatitis C, descubierto a finales de los años ochenta por Prince, quien afirmaba la existencia de un porcentaje de casos de hepatitis post-transfusionales provocados por virus no A y no B ³. Fue finalmente en 1989 cuando el grupo de Choo describió al virus C gracias al clonaje del genoma causante de hepatitis no A y no B, obtenido del plasma de un chimpancé enfermo ⁴.

1.2.1. Estructura del virus de la Hepatitis C

El VHC es un virus de tamaño pequeño (30-60 nm) y morfología esférica. Su genoma es de ARN monocatenario en sentido positivo (9,6 Kb), rodeado por una cápsida icosaédrica y una envoltura glicolipídica que contiene dos importantes glicoproteínas, E1 y E2 (**Figura 1**). Se asocia con lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High density lipoprotein*,), de baja densidad (LDL, del inglés *Low density lipoprotein*,) o de muy baja densidad (VLDL, del inglés *Very low density lipoprotein*)⁵. A veces también aparece asociado a inmunoglobulinas, o en su forma libre en el suero, siendo ésta última la forma menos infectiva frente a la asociada a lipoproteínas, de mayor infectividad. En su estructura viral cuenta con varias proteínas importantes para el ciclo de replicación, las cuales son procesadas en el retículo endoplasmático (RE) a partir de una poliproteína traducida de, aproximadamente, 3100 aminoácidos. El genoma de 3100 aminoácidos está flanqueado por regiones no traducidas 5' y 3' UTR, siendo la 5' la mejor conservada y que permite la unión del ribosoma de células hospedadoras al ARN vírico en una estructura llama IRES (del inglés, *Internal Ribosome Entry Sites*)⁶ (**Figura 2**).

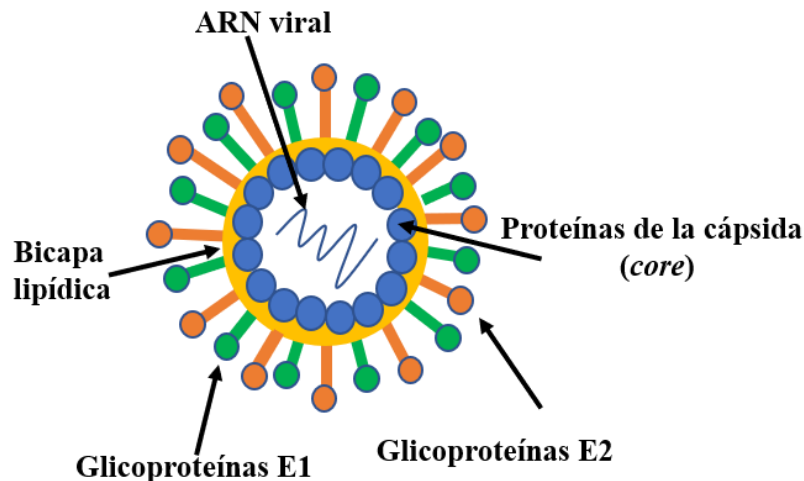


Figura 1. Esquema de la estructura del virus de la Hepatitis C (VHC).

El marco de lectura presenta una región estructural y otra no estructural:

a) La región estructural da lugar a la nucleocápsida o *core* (C), de unos 16 kDa, y cuyo extremo carboxilo terminal tiene especial importancia en la unión a la membrana del RE, las mitocondrias y las gotas lipídicas (LDs, del inglés *Lipid Droplets*), siendo el lugar donde ocurre el proceso de ensamblaje del ARN viral ⁷⁻⁹. Las glicoproteínas gp31 y gp70 (E1 y E2, respectivamente) de la envoltura, también generadas en el dominio estructural, son liberadas de la poliproteína precursora por acción de una peptidasa del hospedador. Su función principal, además de formar la envoltura de la nucleocápsida, es la de servir de enlace entre el virus y los receptores de membrana del hepatocito ^{10,11}. Entre las regiones E1 y E2, concretamente en la zona N-terminal de E2, se encuentra una región hipervariable 1 (HVR1), importante en el proceso de escape al sistema inmune del hospedador por parte del virus.

b) En cuanto a su región no estructural, el virus cuenta con varias proteínas importantes en la replicación, entre las que destaca la proteasa NS3. Ésta tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, presentando actividad serín-proteasa en su extremo amino terminal, por lo que está implicada en el procesamiento de las proteínas no estructurales. Los dominios centrales y carboxilo terminal cuentan con actividad helicasa, esencial en la replicación y traducción del genoma viral ¹⁰. Otra proteína no estructural es la NS4A, cuyo dominio central funciona como cofactor de la proteasa NS3, mientras que el dominio hidrofóbico amino terminal la localiza en la membrana, y el carboxilo terminal se constituye de aminoácidos que establecen la replicación viral ¹². La NS4B es una proteína integral de membrana cuya función principal es alterar las membranas intracelulares y formar una red de membranas denominada “membranous web” necesaria para la formación del complejo de replicación. La NS5A es una metaloproteasa dependiente de cinc fosforilada e implicada en la replicación viral, aunque su función específica aún no está claramente definida. La NS5B es una ARN-polimerasa ARN dependiente, de 70 kDa, implicada en la síntesis del nuevo genoma de ARN. No posee corrección de errores, y de ahí a que este virus contenga un gran número de mutaciones y variabilidad, y, por tanto, mayor

supervivencia en el huésped. La región de la NS5 presenta un sitio de unión de la proteína quinasa R, y una región determinante de la sensibilidad al interferón (ISDR, del inglés *Interferon Sensitivity Determining Region*), estando ambas regiones implicadas en la variabilidad y eficacia del tratamiento. Otras proteínas no estructurales son la NS2, proteasa implicada en el procesamiento de la poliproteína precursora, NS4B, que participa en el anclaje del complejo de replicación viral, y NS5A, una zinc-metaloproteína que tiene un papel en la regulación de la replicación y ensamblaje de la partícula vírica ¹³.

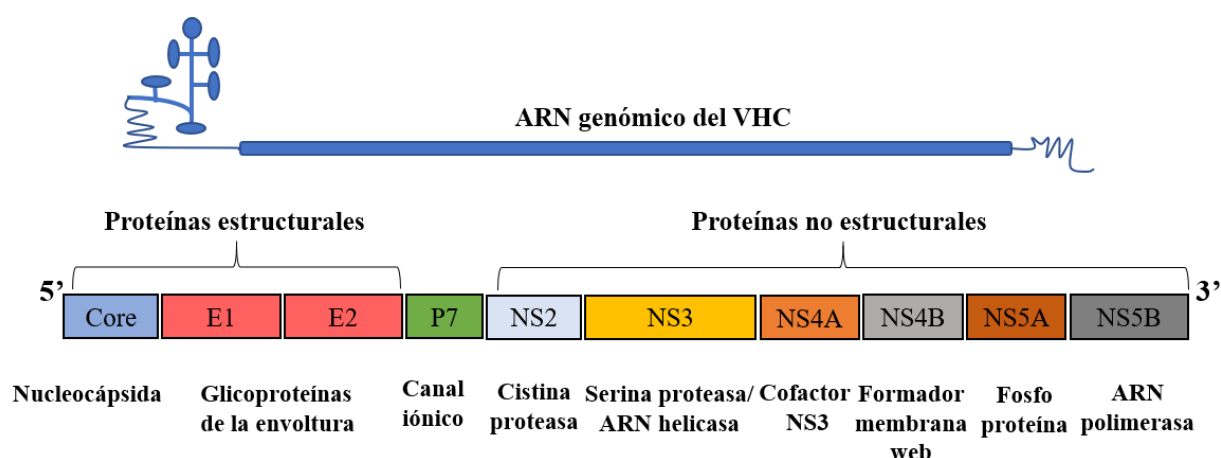


Figura 2. Organización genómica y proteica del virus de la Hepatitis C (VHC).

1.2.2. Variabilidad genética del virus de la Hepatitis C y sus implicaciones

La variabilidad genética del VHC es una característica importante con implicaciones en la patogenia y la persistencia del virus, la selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y el diseño de vacunas.

Existen factores importantes responsables de la elevada variabilidad genética del VHC, siendo la cinética de replicación viral y la alta tasa de error de la enzima responsable de dicha replicación, la ARN polimerasa dependiente de ARN, dos de los principales. El virus presenta una tasa de producción de partículas virales de 10^{12} partículas diarias en pacientes con infección crónica. Además, la tasa de error de la ARN polimerasa es de 10^{-4} ¹⁴. Estos datos

explican la alta capacidad de mutación del VHC, generando una población heterogénea de genomas relacionadas entre sí (homología >98%), y denominadas cuasiespecies ^{15,16}.

El virus de la hepatitis C, además, contiene tres regiones hipervariables (HVR) que incrementan su variabilidad genética. De las tres, la región HVR1 localizada en el extremo N-terminal de la proteína E2 se considera la principal diana de la respuesta inmune. Contiene tres microdominios con tres funciones diferentes, entre las que se encuentran la de servir de unión entre E2 y receptores de clase B, la de facilitar la entrada del virus HCV y la neutralización de anticuerpos ¹⁷. Por otro lado, las regiones hipervariables HVR2 y HVR3 están implicadas en la entrada del virus a la célula y en el proceso de unión de éste, respectivamente ¹⁸. La acumulación de mutaciones acumuladas en estas regiones debido a la alta tasa de error de la enzima polimerasa y la alta tasa de replicación del virus, incrementa el número de variantes intergenoma del virus, lo que da lugar a los genotipos y subtipos ¹⁹.

Los genotipos son los genomas con grado de homología entre el 66 y el 69 %, y existen siete hasta el momento (genotipos 1-7). Estos genotipos se subdividen a su vez en subgenotipos o subtipos, cuando el grado de homología se encuentra entre el 77 y el 80 % (genotipo 1a, 1b, 3a, entre otros), existiendo 67 subtipos. Finalmente, si el grado de homología es superior al 91-95 %, se denominan aislados ²⁰.

Esta hipervariabilidad permite al virus evadir al sistema inmune, contribuyendo a que las infecciones permanezcan, y a que el tratamiento antiviral no tenga una respuesta eficiente. Además, la variabilidad genética tiene gran importancia en la epidemiología del VHC, pues ésta se basa en la divergencia de genotipos debido a los cambios de sus secuencias de nucleótidos. El primer ancestro común del VHC apareció hace más de 2000 años. Desde entonces, y debido a las migraciones y transfusiones sanguíneas, entre otros motivos, se generó la divergencia geográfica. De este modo, los genotipos 1,2 y 3 son los más comunes, más

repartidos y responsables de la mayoría de las enfermedades de hepatitis C. En concreto, abundan en Estados Unidos, Japón y Europa Occidental. En África del Norte predomina el genotipo 4, mientras que, en África del Sur, el genotipo 5. En el sudeste asiático prevalece el genotipo 6, mientras que el 7, con menor relevancia clínica, abunda en paciente de África central y Tailandia ²¹ (**Figura 3**).

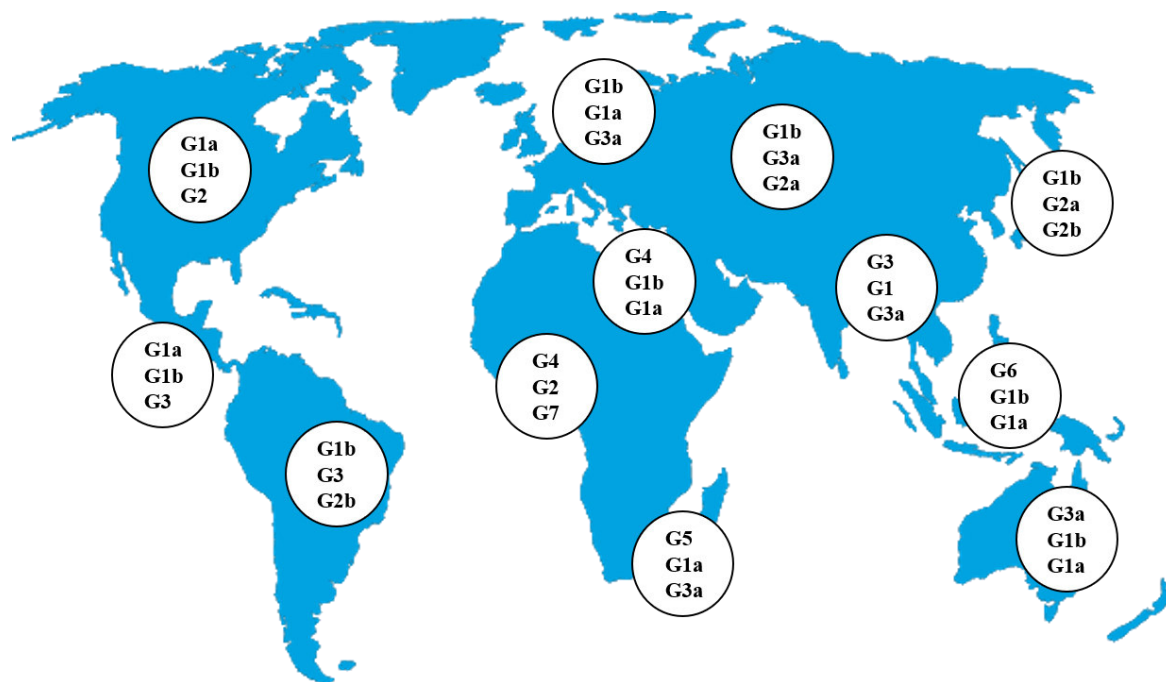


Figura 3. Distribución geográfica de los genotipos del virus de la Hepatitis C (VHC).

1.2.3. Ciclo de replicación del virus de la Hepatitis C

El ciclo de replicación del virus de la hepatitis C es un tema del cual no se tienen claras referencias debido a la carencia de modelos *in vitro* e *in vivo* eficientes de este virus. Es por ello por lo que los mecanismos moleculares que subyacen al virus de replicación no están completamente descifrados debido a su extrema complejidad. Aun así, y gracias a la información de otros virus pertenecientes a la familia de *flavivirus* y a la caracterización de las proteínas recombinantes del VHC, se conocen algunas claves importantes en el proceso de replicación viral.

El primer paso en el ciclo de replicación viral es la entrada a la célula a través de la interacción de las glicoproteínas E1 y E2 del virus con la membrana basolateral del hepatocito. En esta etapa es

importante destacar la asociación del VHC a lipoproteínas. Estas lipoproteínas forman un complejo con el virus denominado lipoviripartícula (LVP), que suelen tener alta similitud con las VLDL y las LDL, lo que le permite pasar desapercibido ante el sistema inmune del huésped (Figura 4).

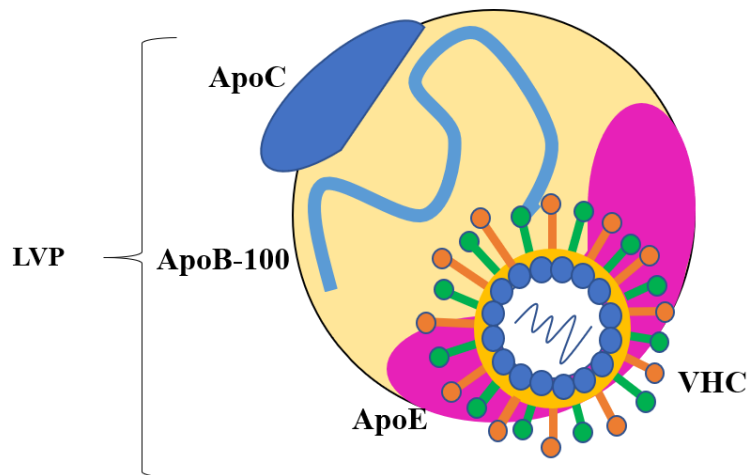


Figura 4. Estructura de una lipoviripartícula (LVP).

Esta asociación está implicada en la entrada del virus al hepatocito humano y al de chimpancé, sus dos únicas dianas, y en etapas posteriores de replicación, maduración y ensamblaje ²². El VHC es capaz de circular unido a las lipoproteínas secretadas por los hepatocitos, estableciendo a continuación interacciones con distintos receptores de membrana. En primer lugar, la región apoE y la región hipervariable E2 interactúan con proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs, del inglés *heparan sulfate proteoglycans*) de la superficie de los hepatocitos, uniéndose posteriormente con el receptor de LDL (LDLr) para la fijación inicial del VHC al hepatocito. Posteriormente, el virus se une a factores de entrada, entre los que se encuentran el receptor scavenger SRB1, tetraspanina CD81 y proteínas de uniones estrechas como claudina-1, para penetrar finalmente al interior celular por una vía de entrada productiva. Tras varias uniones, la partícula viral es endocitada por un proceso mediado por clatrina y dependiente de pH ^{23,24} (Figura 5).

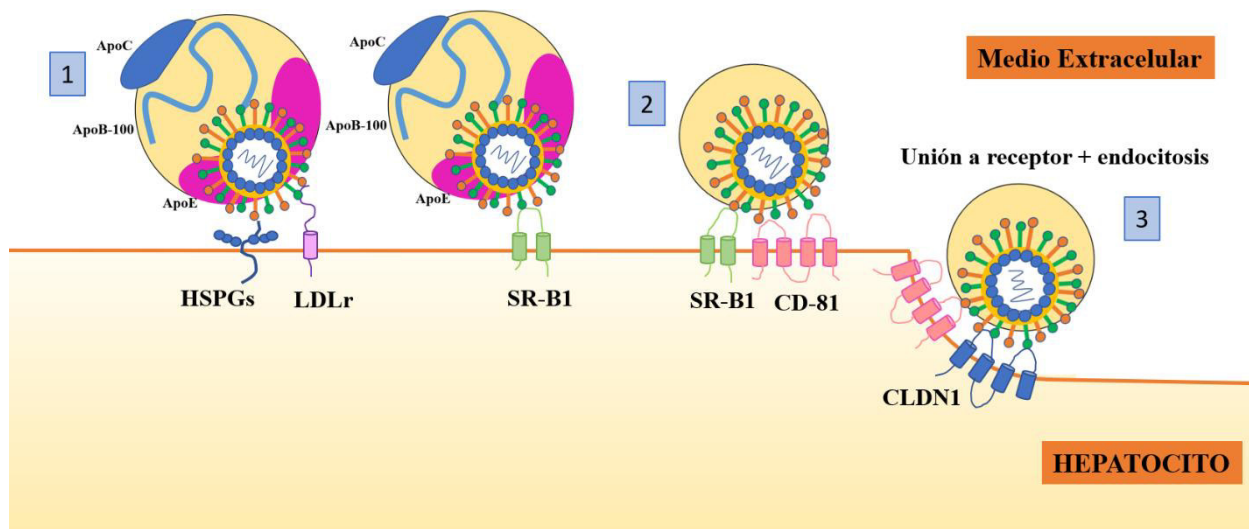


Figura 5. Esquema del proceso de ensamblaje del virus de la Hepatitis C (VHC) en forma de lipoviripartícula a los hepatocitos. 1. Unión del VHC a los factores de fijación inicial a hepatocitos (HSPGs y LDLr). 2. Unión a los receptores de entrada SRB1 y CD81. 3. Internalización mediada por clatrina activadas por CLDN1.

Una vez liberado en el citoplasma celular, se produce la traducción del ARN y procesamiento de la poliproteína en la región IRES del extremo 5'UTR, donde se forma un complejo de traducción con subunidades ribosomales 40S y 60S y otros factores de iniciación (eIF3, eIF2) y metionil-ARN transferente (met-ARN_t)²⁵. Tras el procesamiento de la poliproteína, se constituye el complejo de replicación, formado principalmente por la NS5B y NS3, además de otras proteínas no estructurales como NS4A, NS4B y NS5A, anclándose el complejo a la membrana del retículo endoplasmático. Allí, por acción de la proteína NS4B, se forma un surco llamado membrana web, lugar donde ocurrirá la síntesis de nuevas cadenas de ARN negativo, que servirán para la traducción o para la encapsidación de nuevas partículas víricas²⁶. Finalmente se produce un ensamblaje, maduración y liberación dependiente de lipoproteínas, siendo la partícula viral que sale una lipoviripartícula (**Figura 6**).

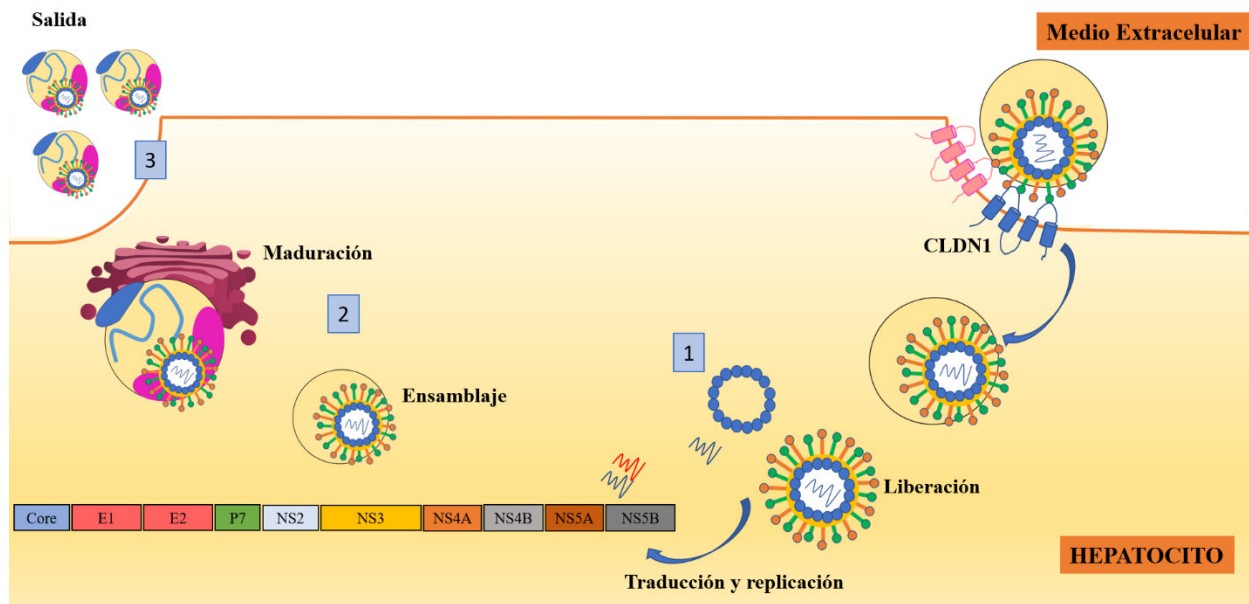


Figura 6. Esquema del proceso liberación, maduración y salida del virus de la Hepatitis C (VHC) en forma de lipoviripartícula en los hepatocitos. 1. Liberación del VHC, traducción de la poliproteína y replicación de su genoma. 2. Ensamblaje del VHC a lipoproteínas y maduración de la lipoviripartícula en el retículo endoplasmático. 3. Salida de las lipoviripartículas, que serán secretadas al torrente sanguíneo.

1.2.4. Sistema de infección *in vitro*

Desde la identificación del genoma del virus de la hepatitis C en el año 1989 en un chimpancé infectado ⁴, se ha intentado desarrollar algún modelo para poder comprender el modo de replicación de este virus y así, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Los primeros estudios de la replicación del VHC *in vitro* se realizaron inoculando un suero con VHC en células MOLT-4 derivada de células T ²⁷. Una semana después de la inoculación, se detectó ARN de cadena negativa en las células y expresión de antígenos virales de la cápsida y la proteína NS4, aunque el nivel de replicación fue muy bajo, no resultando un modelo *in vitro* eficiente. Continuando con las investigaciones, los esfuerzos se concentraron en la inoculación de líneas celulares con origen hepático, debido a que en un estudio *in vitro*, sueros de pacientes VHC positivos infectaron más favorablemente a células humanas derivadas de hepatocitos antes que a aquellas derivadas de células T ²⁸. Sin embargo, los nuevos modelos de inoculación de cultivos de células primarias

hepáticas no presentaron alta reproducibilidad. Esta limitación fue resuelta gracias al desarrollo de los replicones subgenómicos del VHC ²⁹. Los replicones son fragmentos del genoma del VHC que tienen la capacidad de autorreplicarse, debido a que presentan todos los elementos genómicos de los virus necesarios para la replicación y la traducción. Los primeros replicones del VHC fueron del genotipo 1b (Con 1) donde los genes estructurales fueron reemplazados por un gen de resistencia a la neomicina, y a los que se añadió un elemento IRES que aumentó la traducción de proteínas no estructurales del virus. A pesar de que tenían capacidad de autorreplicación, el sistema de replicón no fue capaz de producir partículas virales al no contener genes estructurales. Es por ello por lo que se desarrollaron replicones con todo el genoma completo del VHC ³⁰, pero la aparición de mutaciones adaptativas interfirieron en la producción de partículas ³¹.

Finalmente, se descubrió un replicón subgenómico del VHC de secuencia de genotipo 2a denominado JFH-1 (del inglés, *Japanese fulminant hepatitis*), única cepa de VHC que inducía una hepatitis fulminante, capaz de replicar entre 50 y 500 veces más que los replicones ya conocidos ³². Más tarde, se desarrolló un modelo del cultivo celular del VHC basado en el genoma completo de la cepa JFH-1, capaz de producir partículas infecciosas *in vitro* en células de hepatoblastoma humano (Huh7), las cuales son infecciosas en células, chimpancé y ratón ³³. Al mismo tiempo, se realizaron otros estudios con una línea celular derivada de Huh7, la Huh7.5, en el cual se obtuvieron mejores resultados de producción de partículas infecciosas ³⁴. Se realizó una mejora del sistema de replicón con la generación de una quimera de las cepas J6CF y JFH-1 ³⁵.

1.3. Enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA)

La EHGNA se define por primera vez en 1980 ³⁶ como una acumulación de grasa (>5 %) en células hepáticas en ausencia de una ingesta excesiva de alcohol ³⁷. La enfermedad afecta a más del 30 % de la población del mundo occidental, especialmente a pacientes que padecen síndrome metabólico, obesidad (76 %) y diabetes tipo II (50 %) ³⁸. El espectro histológico de la EHGNA comienza en una simple esteatosis no alcohólica (ENA) benigna, evolucionando hasta una EHNA

(Figura 7). A partir de este punto comienza la consecuente cicatrización y sustitución del tejido por colágeno tipo I, desarrollándose una fibrosis hepática, cirrosis y finalmente, complicándose en muchos casos hasta un carcinoma hepatocelular (CHC) ³⁹.

La patogénesis de esta enfermedad es compleja, y se explica por dos impactos o daños principales al tejido hepático: por una parte, una acumulación lipídica en los hepatocitos, a lo cual se suma un segundo daño por estrés oxidativo ^{40,41}.

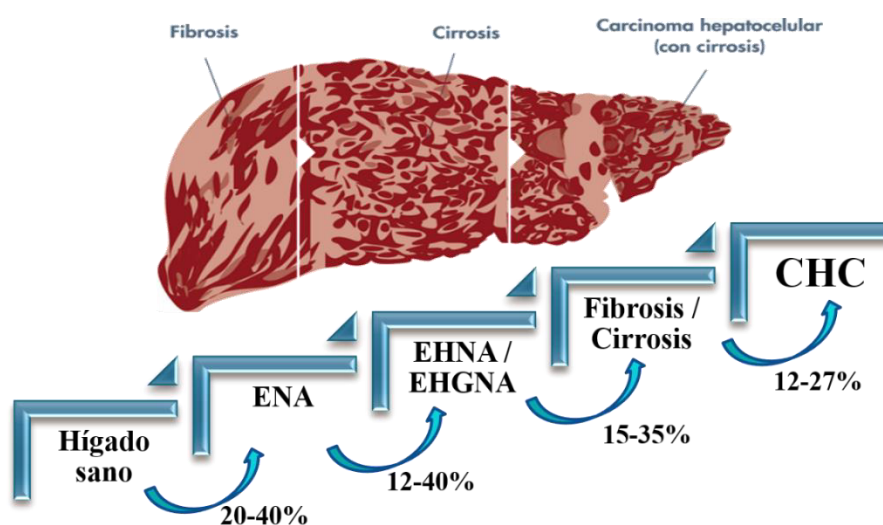


Figura 7. Esquema del espectro histológico de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), desde un hígado sano hasta el desarrollo de un carcinoma hepatocelular.

1.3.1. EHGNA y metabolismo lipídico

Uno de los primeros daños hepáticos que se producen en el inicio de la EHGNA es el acúmulo anormal de triglicéridos en el hepatocito, bien por una ingesta alta de grasas saturadas, sumada a obesidad, o bien por deficiencias genéticas o resistencia a insulina (RI) por hiperglucemia e hiperinsulinemia ^{42,43}. La hiperinsulinemia y el aumento de la producción hepática de glucosa inducen la expresión de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*) y de la proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos (ChREBP, del inglés *Carbohydrate-response element-binding*

protein), respectivamente, las cuales activan a su vez la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis hepática de ácidos grasos (AGs) a partir del exceso de hidratos de carbono, disminuyéndose la beta oxidación de los mismos ⁴⁴. Además, existen una serie de moléculas mediadoras en la secreción y acumulación anormal de lípidos en el tejido hepático, como la enzima ácido graso sintasa (FAS, del inglés *Fatty Acid Synthase*), implicada en la síntesis excesiva de ácido grasos, ya que cataliza el último paso en la biosíntesis de éstos ^{45,46}. La secreción de lípidos en el hígado está mediada por la apolipoproteína apoB100 y por la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTTP, del inglés *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*), por lo que su sobreexpresión puede causar cambios en la secreción de lípidos, y está relacionada con una mayor hiperlipidemia en la enfermedad hepática ⁴⁷. Asimismo, existen enzimas involucradas en la inducción de la esteatosis hepática, como la diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1), una proteína transmembrana que funciona como una clave metabólica, ya que es responsable de la esterificación de los ácidos grasos exógenos, contribuyendo al desarrollo de una mayor esteatosis hepática ⁴⁸.

1.3.2. EHGNA, estrés oxidativo y lipotoxicidad

Sumado al daño por acumulación lipídica, un segundo impacto que explica las lesiones histológicas características de la EHGNA es el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica ^{40,49}. Como consecuencia del daño hepático y la inflamación del hígado, tanto las células inflamatorias como el propio hepatocito liberan citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α , del inglés, *Tumor Necrosis Factor alpha*) y especies reactivas de oxígeno (EROS). Estos mediadores pueden provocar la peroxidación de membranas plasmática y mitocondrial, lo cual deriva en muerte celular por necrosis o apoptosis ^{40,50}. Todo ello activa las células endoteliales del hígado, que incrementan la expresión de citoquinas, y finalmente activa a las células estrelladas hepáticas (CEH), produciéndose un cambio fenotípico de las mismas, asociado a la adquisición

de funciones pro-fibrogénicas y pro-inflamatorias ^{51,52}. La alta acumulación de triglicéridos y colesterol en forma de partículas VLDL y LDL, sumado al estrés oxidativo desarrollado en los hepatocitos, tiene como consecuencia la oxidación del colesterol unido a LDL, generándose partículas de LDL oxidadas (oxLDL) que constituyen un importante factor de riesgo de la enfermedad ^{53,54}. Recientes estudios demuestran que las oxLDL contribuyen también al proceso de inflamación e incremento de los niveles de EROS, participando a la activación de las CEH y al desarrollo de la fibrosis hepática ⁵⁴.

1.3.3. EHGNA, inflamación e inflamasoma

La inflamación se considera el principal factor involucrado en el daño hepático, ya que participa en la progresión de EHGNA a fibrosis severa, hasta que finalmente desarrolla carcinoma hepatocelular ⁵⁵. La EHGNA, tal y como se ha desarrollado en apartados anteriores, se inicia por la acumulación de lípidos en los hepatocitos y daño por estrés oxidativo ⁴⁰, generando un entorno necroinflamatorio que termina activando a las CEH ⁵⁶. Ante este daño oxidativo en los hepatocitos ⁵⁷, se activan enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) para mitigar este efecto. Además, la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*) es una de las consecuencias directas de este proceso inflamatorio y oxidativo ⁵⁸, que contribuye a la destrucción del tejido local durante la inflamación crónica ⁵⁹. Estas enzimas se presentan como buenos marcadores de estrés oxidativo, así como la proteína-1-quimioatrayenye de infiltración de macrófagos y monocitos ^{58,60-62}, o el receptor de la proteína tirosina fosfatasa tipo G (PTPRG, del inglés *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type G*). Las PTP son moléculas de señalización que regulan varios procesos, entre los que se encuentran la diferenciación, el ciclo celular o la transformación oncogénica. Recientemente se ha relacionado con el proceso inflamatorio en un contexto de obesidad, ya que su expresión es inducida por una señalización inflamatoria ⁶³. La acumulación excesiva de lípidos causa un daño en los hepatocitos,

activando una respuesta inflamatoria que agrava el progreso de la enfermedad, alimentando la activación de la inflamación ⁶⁴.

La liberación de estos ácidos grasos saturados y lípidos peroxidados durante el daño celular se reconocen como moléculas endógenas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*), entre los cuales se encuentran los receptores de tipo NOD (NLR), siendo el inflamasoma NLRP3 el mejor caracterizado. El inflamasoma NLRP3, una vez que reconoce estas moléculas, se activa y puede asociarse y formar un complejo con la proteína ASC (ASC, del inglés *Apoptosis-associated Speck-like Protein*), activando la caspasa-1 e induciendo la maduración y secreción de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 1B (IL-1B) e interleuquina 18 (IL-18) ^{65,66}. De esta manera induce una señalización proinflamatoria, al mismo tiempo que produce la activación de las CEH, conduciendo a la progresión del proceso fibrogénico (**Figura 8**).

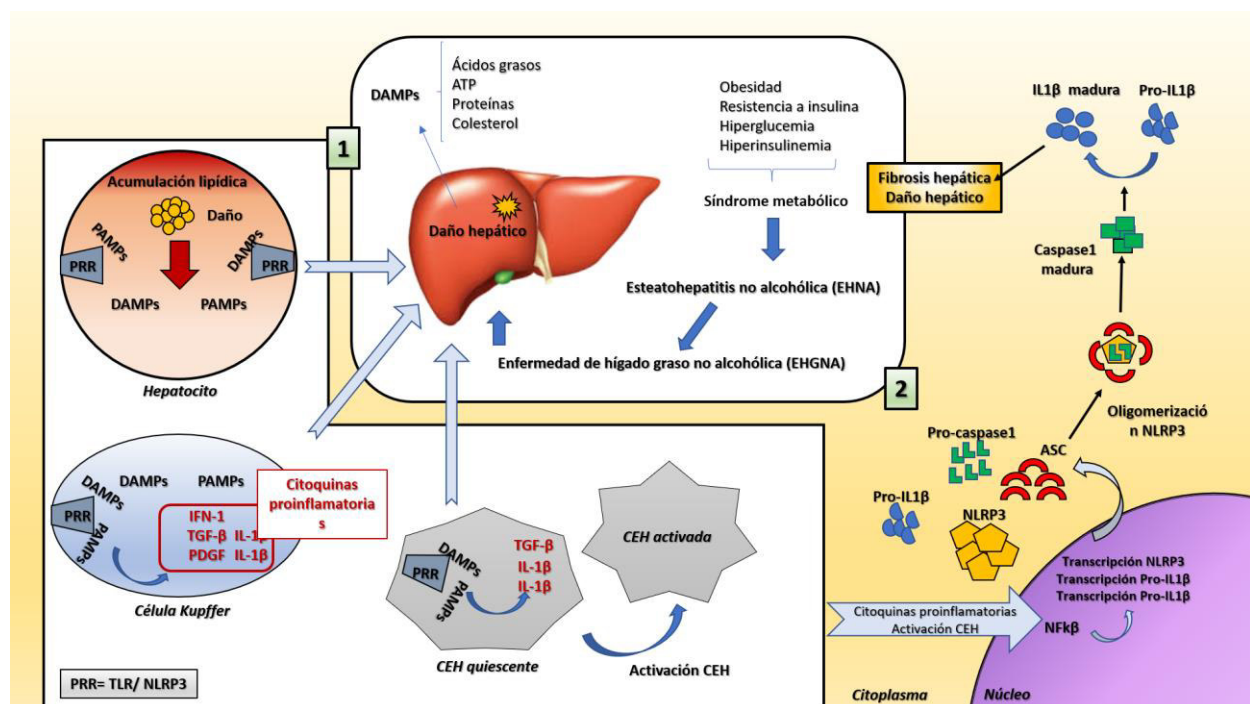


Figura 8. Esquema relacional entre la enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA), fibrosis hepática e inflamasoma. 1. La acumulación lipídica debido a dieta alta en grasa, obesidad, hiper glucemia e hiperinsulinemia relacionado con el desarrollo de EHGNA, provocan un daño en el hígado que desencadena la producción de citoquinas

proinflamatorias en las células de Kupffer, provocando la activación de células estrellas quiescentes. 2. La activación de las CEH y la producción de citoquinas proinflamatorias activan la transcripción de los distintos componentes del complejo NLRP3 inflamasoma (Pro-caspasa1, ASC, NLRP3), que oligomerizan en el citoplasma y provocan la activación de IL1 β , la cual acentúa el daño hepático, promoviendo la activación de las CEH y el desarrollo de fibrosis hepática.

1.3.4. EHGNA y fibrosis hepática

Cualquiera de estos mecanismos necroinflamatorios descritos anteriormente puede activar a las CEH, principales implicadas en el proceso de fibrogénesis hepática. Fue Karl Kupffer quien, en el año 1876, descubrió un grupo de células con prolongaciones cuando intentaba buscar fibras nerviosas en el hígado, a las cuales llamó células estrelladas del hígado ⁶⁷. Estas células son mesenquimales, perisinusoidales, ubicadas a lo largo de las sinusoides en el espacio de Disse, aunque también se observan entre las células parenquimatosas. Este espacio suele contener fibras nerviosas y algunos componentes de la matriz extracelular (MEC), como fibras de colágeno tipo I y III y componentes de la membrana basal, sin llegar a formar una membrana basal verdadera. Las células estrelladas hepáticas se caracterizan por tener en su citoplasma pequeñas gotitas de grasa de 1-2 micras de diámetro que permiten el almacenamiento de la vitamina A, una de sus principales funciones. Aparte, controlan la comunicación intercelular por medio de la liberación de mediadores, y participan en la homeostasis de la MEC del hígado por la producción de componentes colágenos y no colágenos, síntesis de metaloproteinasas (MMP) que catabolizan los componentes de la MEC, y síntesis de inhibidores de las MPP, también llamados inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP, del inglés *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) que controlan la actividad catalítica de las MMP a fin de mantener una homeostasis de la MEC ⁶⁸. Por tanto, tras la lesión crónica del tejido hepático, tanto las CEH como otras células productoras de la MEC sufren un proceso de activación, proceso patológico que se caracteriza por la pérdida de las gotitas de grasa, aumento del número y del tamaño de las células, y la transdiferenciación

fenotípica a células proliferativas, fibrogénicas y contráctiles, las cuales serán muy similares a los miofibroblastos. Todo ello está mediado por distintos factores inductores de la proliferación celular, mediadores fibrogénicos como el factor transformador del crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, del inglés, *Transforming growth factor $\beta 1$*) y la interleuquina 6 (IL-6), inductores de la contracción de las CEH, como endotelina-1, trombina o angiotensina II y por último mediadores de la actividad anti-inflamatoria y anti-fibrogénica, como la interleuquina 10 (IL-10) y el interferón- γ (IFN- γ) ⁶⁹ (Figura 9).

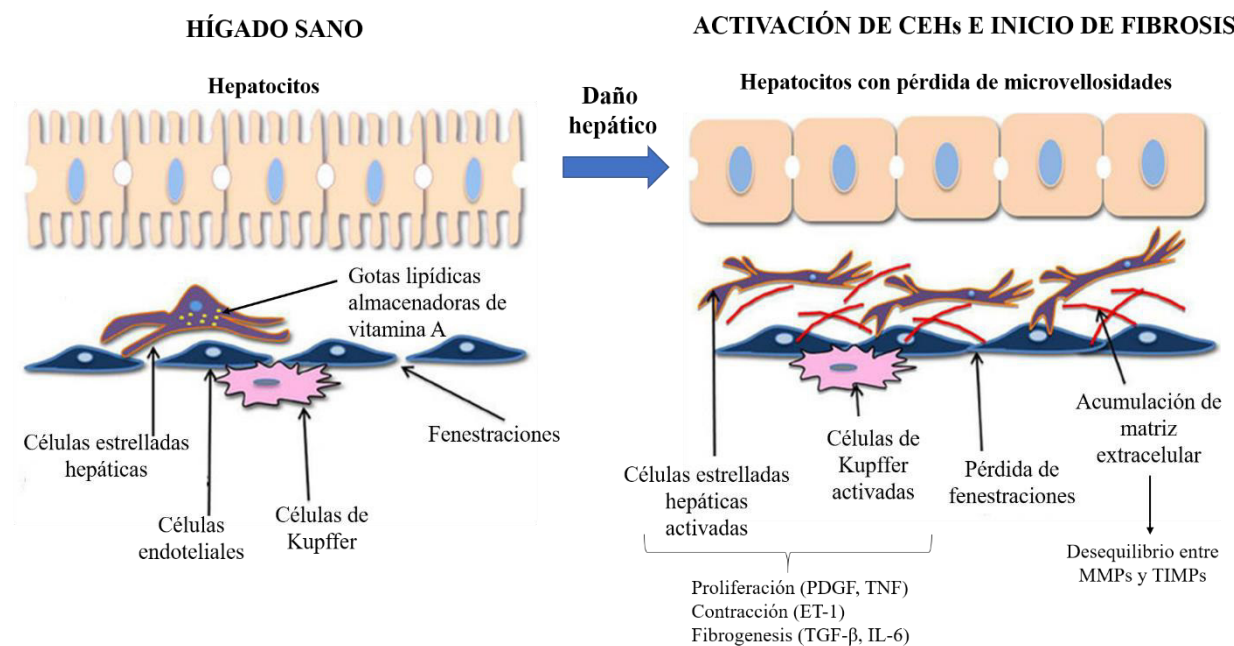


Figura 9. Activación de las CEH desde un estado inactivo (imagen modificada de Delgado Coello, B. A., & Mas Oliva, J. (2017). Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática). ⁷⁰

Como consecuencia de la activación de las CEH, se producen modificaciones fenotípicas que repercuten en el desarrollo de la fibrosis hepática, como la producción de proteínas colágenas y no colágenas de la MEC (colágeno tipo I, tipo III, tipo IV, laminina, elastina, fibronectina y diversos proteoglucanos) por parte de las CEH. Además, se inhibe la degradación de la matriz extracelular por la inactivación de las MMP por parte de las TIMP (TIMP-1 y TIMP-2), inhibidores expresados únicamente en las CEH ⁷¹. La adquisición de funciones contráctiles por

parte de las CEH tras su activación se produce por varias causas, entre ellas, por la aparición de estructuras contráctiles como los cuerpos densos y la actina- α del músculo liso, lo cual conduce a una tensión citoesquelética mayor, promoviendo la contracción muscular por el aumento de la concentración de Ca^{2+} ⁷². En este proceso de contracción muscular la actina- α participa asociada a la tropomiosina (TPM), proteína reguladora de la contractibilidad por el bloqueo de sitios de unión de actina a miosina. Del mismo modo que la actina- α , la TPM suele estar expresada en altos niveles en las CEH activadas, convirtiéndose en un importante mediador y marcador del proceso fibrótico ⁷³.

En los últimos años, se ha descubierto un importante factor de transcripción implicado en el proceso de fibrosis hepática, denominado GATA4. El factor de transcripción GATA4, con dominios de dedos de cinc, controla la diferenciación y especialización de múltiples tipos celulares durante el desarrollo embriogénico. Varios estudios han demostrado una inhibición de la expresión de GATA4 en tejido hepático cirrótico, sumado a que la sobreexpresión de este factor en una línea celular LX2 de células estrelladas hepáticas disminuía los niveles de fibrosis ⁷⁴. En modelos de ratón con daño hepático por tetracloruro de carbono (CCl_4), la inducción de la fibrosis se veía acelerada ante una insuficiencia de los niveles de este factor de transcripción, lo cual lo señala como un importante regulador de la activación de las CEH y la inhibición del proceso fibrogénico del hígado, convirtiéndolo en un excelente marcador para el estudio de esta patogénesis.

1.4. Tratamientos actuales en la enfermedad hepática

1.4.1. Tratamientos actuales frente a la hepatitis C

Las terapias desarrolladas contra el VHC se han enfocado a frenar su replicación, con el objetivo de erradicar su infección vírica. De este modo se podrían prevenir las complicaciones relacionadas con la enfermedad, como la necroinflamación la fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma, mejorando la vida de los pacientes y previniendo la transmisión de la

infección por el virus. El tratamiento frente a la hepatitis C ha ido progresando desde la primera terapia basada en IFN- α combinado con ribavirina ⁶. Las limitaciones de este tratamiento y su baja eficiencia llevaron al desarrollo de antivirales de acción directa frente a proteínas virales específicas. Las proteínas NS3, NS5A y NS5B han sido las dianas principales en las que se han basado las terapias frente a la infección por el VHC. Los primeros inhibidores de proteasa NS3 fueron boceprevir, telaprevir y simeprevir, combinados con IFN- α y ribavirina ⁷⁵. A pesar del aumento de la tasa de respuesta en pacientes con hepatitis C crónica, existían considerables efectos secundarios que hicieron necesaria la búsqueda de nuevas terapias, produciéndose en 2013 la aprobación de un inhibidor de la ARN polimerasa NS5B (nucleósido y no nucleósido) específico del VHC, el sofosbuvir ⁷⁶. Con la llegada de sofosbuvir aumentó la tasa de respuesta sin necesidad de combinarlo con IFN- α , sobre todo en pacientes con genotipo 1. La tasa de respuestas en pacientes infectados por el resto de genotipos aumentó a partir de la combinación del sofosbuvir, en los años 2015-2017, con otros agentes inhibidores de la ARN polimerasa NS5B no nucleósido del VHC, como dasabuvir, antagonistas de la NS5A como daclatasvir, ledipasvir, elbasvir, ombitasvir, pibrentasvir y velpatasvir e inhibidores de la proteasa NS3/4A, como glecaprevir, grazoprevir, paritaprevir o voxilaprevir ^{77,78} (**Tabla 1**).

Tabla 1. Antivirales de acción directa (AAD) actuales aprobados en Europa en 2018 (datos EASL 2018) frente al virus de la hepatitis C (VHC). Genotipos VHC dianas y combinación de AAD.

AAD		
Tipo de AAD	(Genotipos VHC diana)	Combinación de AAD
Inhibidores de la polimerasa NS5B (nucleósido y no nucleósido)	Sofosbuvir (1-4)	
Inhibidores de la polimerasa NS5B (no nucleósido)	Dasabuvir (1)	Sofosbuvir + velpatasvir
	Daclatasvir (3)	Sofosbuvir + velpatasvir+ voxilaprevir
	Ledipasvir (1)	Glecaprevir+ pibrentasvir
Inhibidores de la NS5A	Elbasvir (1)	Sofosbuvir+ledipasvir
	Ombitasvir (1)	Paritaprevir+Oombitasvir
	Pibrentasvir (1-6)	Grazoprevir+elbasvir
	Velpatasvir (1-6)	
	Glecaprevir (1-6)	
Inhibidores de la proteasa NS3/4A	Grazoprevir (1,3,4)	
	Paritaprevir (1)	
	Voxilaprevir (1-6)	

A pesar de la gran potencia y alta eficacia de estos inhibidores, sin mostrar apenas efectos secundarios, la evolución del VHC ha conducido a numerosas variaciones genéticas en el genoma del virus, desarrollando una alta resistencia frente a los distintos fármacos ⁷⁹. Sumado a ello, y a

pesar de que los precios de estos antivirales se han reducido en países de ingresos bajos y medianos, aún siguen siendo costosos y el tratamiento limitado. De hecho, según datos de la OMS, en 2017, de los 71 millones de personas infectadas por el VHC en el mundo, tan sólo 13,1 millones de estas (19 %) estaban diagnosticadas, de las cuales sólo 2 millones habían sido tratadas con antivirales de acción directa a finales de año. En este contexto, se hace necesaria la búsqueda de nuevos antivirales y tratamiento preventivos, de bajo coste y total accesibilidad a países desarrollados y en vías de desarrollo, así como los más desfavorecidos, con el fin de lograr la eliminación total de infecciones por VHC en el mundo.

1.4.2. Tratamientos actuales frente a la EHGNA y fibrosis hepática

Ante una lesión hepática aguda, el hígado puede restaurarse en un intervalo de tiempo corto, a diferencia de si se produce una lesión hepática crónica, donde un daño tisular repetido impide su capacidad regenerativa, sobre todo debido a un infiltrado inflamatorio alterado. La respuesta a las lesiones crónicas incluye apoptosis de células del parénquima, reemplazándose por aquellas de la MEC, que terminan cicatrizando el tejido e iniciando un proceso de fibrosis y disfunción hepática. Hasta la fecha, las terapias para combatir la fibrosis hepática se han centrado en eliminar el agente causante de la misma, como el bloqueo de la replicación de los virus de las hepatitis B y C, actuar frente a EHNA y EHGNA, o suprimir la inflamación hepática, ya que el diseño de terapias específicamente antifibróticas se hace complicado por la dificultad de revertir la fibrosis hepática en etapas tardías de la enfermedad ⁸⁰. Los datos de pacientes con enfermedad crónica hepática durante 30 años o más confirman que la reversibilidad total de la fibrosis hepática en estas etapas está lejos de alcanzarse. De hecho, en etapas avanzadas de esta enfermedad, hay una alta reticulación de colágeno, alta presencia de elastina y una resistencia a la apoptosis en las CEH ⁸¹. A pesar de esta evidencia, existen estudios donde la reversibilidad de la fibrosis es posible. Un ejemplo es la apoptosis específica de las CEH en un modelo *in vivo* tras la administración de

gliotoxina, de manera que podría revertirse la fibrosis ⁸². Esta reversión puede ser explicada porque las CEH, tras su activación, pueden volver a un estado parcialmente inactivado. Durante ese estado de inactividad parcial, algunas CEH activadas revierten a inactivadas, mientras que las restantes se activan y se vuelven apoptóticas. Parece ser que la falta de señales de supervivencia en un entorno no fibrogénico contribuye a esta reversión y a la apoptosis de las células estrelladas hepáticas. El problema radica en que aquellas CEH revertidas parecen ser más susceptibles a señales pro-fibrogénicas ⁸³, por lo que vuelven con mayor facilidad a un estado activo. Otros estudios apuestan por la aplicación de sistemas de nanopartículas en el tratamiento de la fibrosis hepática. Ésta se basa en el uso de nanopartículas como las nanomicelas y los liposomas para la administración de fármacos que sean específicos para atacar a las CEH activadas en una fase temprana, donde la reversión aún es posible ⁸⁴. A pesar de estos estudios, aún se necesita indagar en el tratamiento antifibrótico, ya que, como se describía al inicio de este capítulo, las terapias están enfocadas a frenar los agentes causantes de la misma, entre los que también se encuentra la EHGNA. La EHGNA puede combatirse desde diferentes dianas terapéuticas. Una de ellas es la resistencia a insulina característica de esta enfermedad, que genera una acumulación lipídica en el tejido ⁸⁵. Para ello, las tiazolidinedionas como rosiglitazona y pioglitazona, modulan la distribución de lípidos en el tejido adiposo y regulan la sensibilidad a insulina ⁸⁶. El estrés oxidativo también está implicado en la progresión de la fibrosis en pacientes con NAFLD. Es por ello por lo que la vitamina E se ha establecido como un tratamiento para esta enfermedad debido a su capacidad antioxidante, que protege la estructura celular frente al daño por radicales libres de oxígeno y peroxidación lipídica ⁸⁷. El receptor X farnesoide es un receptor de hormonas que parece estar implicado en la reducción de la esteatosis hepática, por lo que su regulación a través de agonistas como el ácido obeticolico, cilofexor y tropifexor también ayudarían a disminuir la adiposidad y, por tanto, tratar de manera indirecta la EHGNA y la fibrosis hepática ⁸⁸. Sumado a estas terapias, los receptores PPAR suelen establecerse como una posible diana para el desarrollo

de fármacos frente a EHGNA, debido sobre todo a su papel, en función del tipo de receptor, en el metabolismo lipídico y la inflamación. En este contexto, elafibranor es un fármaco agonista tanto de PPAR α y PPAR δ , funcionando como tratamiento para la EHGNA por sus efectos protectores frente a la esteatosis, inflamación y la fibrosis hepática ^{89,90}. La lipogénesis *de novo* ha sido otra diana clave en el desarrollo de terapias frente a esta enfermedad, existiendo inhibidores de la misma como aramchol, el cual, además, inhibe a la esteatoil-coenzima A desaturasa implicada en la lipotoxicidad y la microinflamación ⁹¹. Las hormonas tiroideas también juegan un papel principal en la regulación de la homeostasis y del metabolismo lipídico, por lo que disfunciones tiroideas como las del hipotiroidismo se asocian a resistencia a insulina y dislipemia, además de ser un factor de riesgo para la EHGNA ⁹². Esto hace que agonistas del receptor β de hormona tiroidea, como resmetirom, mejoren la función tiroidea, teniendo efectos a su vez de reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos ⁹³. Emricasan, un inhibidor irreversible de caspasa, reduce la inflamación fibrosis en modelos animales de EHGNA, reduciéndose la acumulación de lípidos ⁹⁴ (**Figura 10**). A pesar de la ingente cantidad de fármacos descritos frente a la EHGNA, actualmente se encuentran en su mayoría en diferentes fases en ensayos clínicos, no estando aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*). Por ello, el tratamiento de EHGNA y fibrosis sigue limitándose al control de factores de riesgo, existiendo la necesidad de indagar aún más en el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas frente a esta enfermedad.

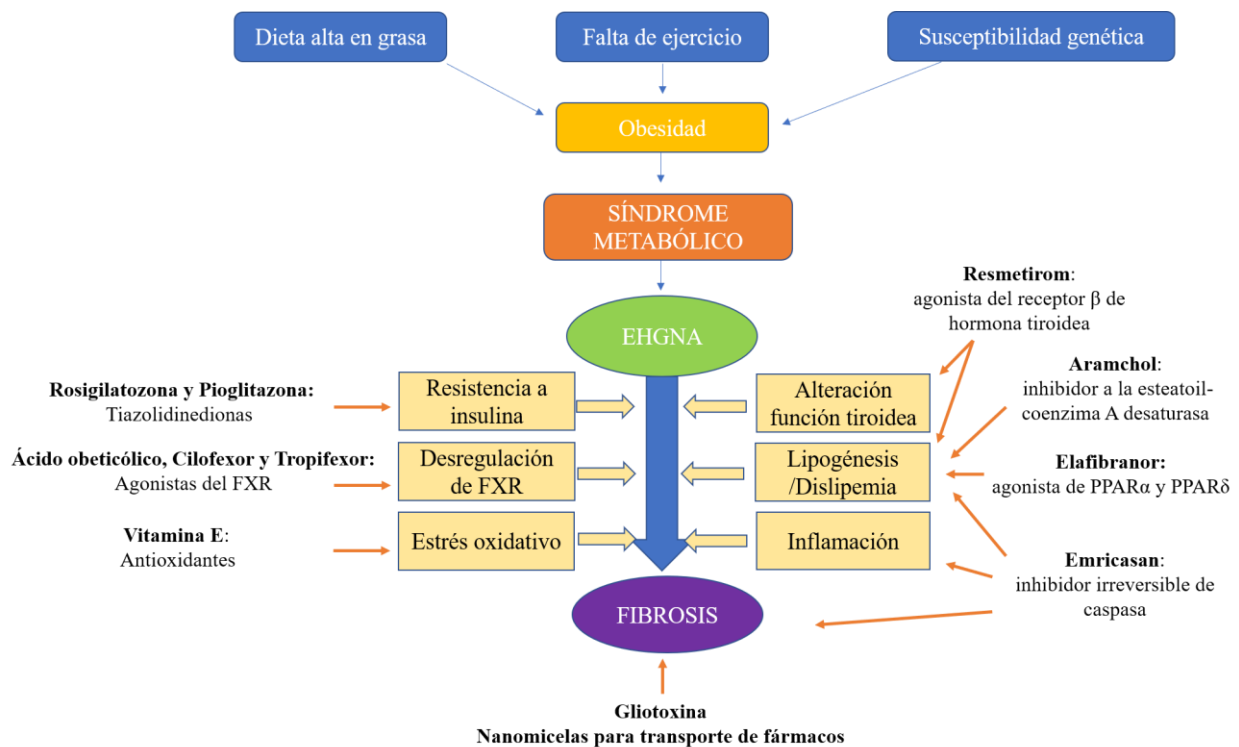


Figura 10. Tratamientos actuales frente a la enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA) y la fibrosis hepática.

1.5. Tratamientos naturales con extractos de hongos

1.5.1. Tratamientos naturales en la Hepatitis C

En estos últimos años ha aparecido un gran interés por productos de origen natural que puedan tener poder inhibidor frente a la replicación del VHC, siendo utilizados como tratamientos preventivos. Un ejemplo de ello es la quercetina, flavonoide abundante en frutas y vegetales, con un papel protector en numerosas enfermedades por su actividad antioxidante, fundamentalmente. Además, presenta la capacidad de modificar niveles de lípidos, disminuyéndolos tanto en suero como en tejidos hepáticos, pues a corto plazo impide la síntesis de AG y triacilglicéridos (TGs). Esta acción se debe a que la quercetina es capaz de inhibir a dos proteínas, acetil-CoA carboxilasa (ACC) y diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), implicadas en la síntesis de TGs. Como ya se dijo antes, el VHC está asociado al

metabolismo lipídico, pues desarrolla su ciclo de vida en forma de LVP. De este modo, si se reducen los niveles de lípidos, se podría actuar en la entrada, replicación, ensamblaje, maduración y liberación de partículas virales del VHC ⁹⁵. Por otro lado, la quercetina también es capaz de impedir la traducción del ARN viral al bloquear la formación del complejo de traducción, formado en parte por NS5A y proteínas HSPs (del inglés, *Heat shock proteins*), pues disminuye los niveles de expresión de estas últimas. Estas propiedades otorgan a la quercetina un importante papel en la enfermedad de la hepatitis C como nuevo fármaco de origen natural con carácter preventivo.

Otros estudios han descrito inhibidores naturales de la proteasa NS3/4A, como los elagitaninos presentes en el extracto crudo de granada ⁹⁶ y otros compuestos encontrados en extractos de esponja de mar, como halisulfato 3 y suvanina, inhibidores de la actividad helicasa NS3 del VHC ⁹⁷.

Entre estos inhibidores de origen natural, los hongos comestibles como el champiñón común (*Agaricus bisporus*), la seta de ostra (*Pleurotus ostreatus*), o el Shiitake (*Lentinus edodes*), están cobrando una gran fuerza como fuente de antioxidantes y otros elementos que pudieran tener un papel importante en enfermedades como la hepatitis C. Se ha descubierto que los hongos comestibles son una fuente primaria de ergotioneína, conocida por sus propiedades antioxidantes ^{98,99}. Estudios de la composición de la pared celular y otras estructuras de los hongos, revelan numerosos componentes susceptibles de ser evaluados como posibles inhibidores de la replicación del VHC. Entre ellos, y formando un complejo con la quitina, se encuentran los β -glucanos, los cuales parecen tener un papel en la activación del sistema inmune frente a una infección por el VHC, ya que favorecen la liberación de citoquinas ^{100,101}. A estas propiedades se le suma su alto contenido en fibra, que facilita la evacuación de toxinas y regula el contenido de colesterol, disminuyendo niveles de ácidos grasos, y su alto contenido en vitaminas y minerales, importantes en la nutrición y salud. Esta composición es diferente en los tallos y

cuerpos fructíferos (carpóforos) de los hongos, siendo mayor el contenido en oligoglucanos (α y β) y oligopéptidos de bajo peso molecular, quitina, polifenoles, antioxidantes, vitaminas y metabolitos secundarios en los cuerpos fructíferos, mientras que los tallos contienen sobre todo quitina, glucanos y proteínas de alto peso molecular ¹⁰²⁻¹⁰⁴.

El estudio de estos hongos comestibles como fuente de posibles inhibidores del VHC parece interesante, más aún cuando se conoce su alto contenido en compuestos que ya han mostrado capacidad beneficiosa y buenos resultados en el tratamiento de la hepatitis en general. De las posibles dianas, la ARN polimerasa NS5B y la proteasa NS3/4A del VHC son las más estudiadas, pues están implicadas directamente en la replicación viral, lo que conlleva a la formación exitosa de nuevas partículas virales. La importancia de que estas proteínas sean las dianas hace posible que las estrategias terapéuticas vayan mucho más allá del tratamiento de un único virus, como el de la hepatitis C, pues existen otros, como el virus del Dengue o el de la Fiebre amarilla, que comparten características con el VHC. Ambos pertenecen a la familia de los flavivirus, y las diferentes partículas virales tienen una estructura similar entre ambos, y con el VHC. De hecho, sofosbuvir, fármaco inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC, presenta la capacidad de bloquear también a la polimerasa del virus de la Fiebre amarilla ¹⁰⁵. Respecto al virus del dengue, sofosbuvir también presenta actividad inhibidora frente a su ARN polimerasa ¹⁰⁶. En cuanto a su proteasa NS3/4A ocurre algo similar, ya que comparten características estructurales en los distintos virus, habiendo inhibidores propios de la NS3 del VHC, como telaprevir y asunaprevir, con actividad inhibidora frente a la proteasa NS3 del virus del Dengue ¹⁰⁷. Estos datos abren un campo de posibilidades en el tratamiento natural con champiñones, que no sólo se centraría en el virus de la hepatitis C, ya que podría extenderse al tratamiento de infecciones por otros flavivirus como el del Dengue y la Fiebre Amarilla en un futuro.

1.5.2. Tratamientos naturales en la EHGNA y fibrosis hepática

Las nuevas estrategias basadas en productos de origen natural aparecen también como una opción para el tratamiento de la fibrosis hepática. Entre dichas estrategias se encuentran el uso de alcaloides como la halofunginona, aislada de la planta *Dichroa febrífuga* y capaz de disminuir la síntesis de colágeno-1 α ¹⁰⁸, o la toxina fúngica gliotoxina, producida por *Aspergillus fumigatus*, que induce la apoptosis en células del sistema inmune y en las CEH ¹⁰⁹. En la medicina tradicional se ha utilizado un compuesto obtenido de la planta *Salvia miltiorrhiza*, el Sho-saiko, capaz de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en las CEH ¹¹⁰. La genisteína, una isoflavona bioactiva extraída de la soja, también ha resultado beneficiosa en el tratamiento de la EHGNA, actuando frente a la lipotoxicidad, inflamación, fibrosis e incluso con tumores relacionados con esta enfermedad hepática ¹¹¹.

Diferentes estudios realizados en modelos animales han desvelado una estrategia terapéutica frente la fibrosis hepática y la acumulación lipídica en la inhibición de la expresión de una enzima implicada en la formación de triglicéridos, la diacilglicerol aciltransferasa. Este efecto inhibitorio es realizado por el flavonoide quercetina, abundante en frutas y vegetales, el cual presenta, además de una importante actividad antioxidante, la capacidad de disminuir niveles lipídicos en suero y en tejido hepático por la ya dicha inhibición de la DGAT ^{112,113}. Cabe destacar, entre estas estrategias terapéuticas, y del mismo modo que para el tratamiento de VHC, el uso de hongos ricos en compuestos bioactivos como polisacáridos, terpenos, ácidos fenólicos, esteroides y otros metabolitos, los cuales presentan una potente actividad antiinflamatoria, además de actuar frente al crecimiento tumoral y la acumulación de lípidos en sangre ¹¹⁴. Actualmente se conocen varias especies de hongos, incluyendo las especies *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*, capaces de reducir el nivel de colesterol en sangre e hígado ^{115,116}. A estos se le suma la especie de hongo Mukitake (*Panellus serotinus*), pues un estudio demostró su capacidad para

paliar los efectos de la EHGNA en ratones *ob/ob* ¹¹⁷, aunque los compuestos bioactivos y su mecanismo de acción no han sido identificados.

La activación de las CEH y el desarrollo de EHGNA están promovidos por el estrés oxidativo, por lo que sustancias antioxidantes tales como la vitamina E, glutatión y L-cisteína inhiben dicha activación, frenando la progresión de fibrosis hepática ¹¹⁸. Recientemente, se han encontrado numerosos antioxidantes en plantas, incluyendo el té, la fruta y los vegetales. El hongo *Lentinus edodes*, conocido comúnmente como *Shiitake*, contiene numerosos compuestos con propiedades inmunopotenciadoras, hepatoprotectoras y antioxidantes ^{119,120}. En concreto, el micelio de este hongo presenta una importante actividad antioxidante que protege al hígado del daño por CCl₄, siendo el responsable de esta actividad la dimetilnitrosamina (DMN), capaz de suprimir el desarrollo de fibrosis hepática y la activación y proliferación de las CEH. Todo ello hace de los champiñones un potente recurso para el desarrollo de estrategias terapéuticas naturales frente a la fibrosis y la EHGNA.

1.5.3. *Agaricus bisporus* y sus propiedades terapéuticas

Agaricus bisporus (champiñón común) es una especie de hongo comestible con un alto contenido en compuestos biológicamente activos, lo cual le confiere diferentes propiedades, muchas de ellas terapéuticas, para poder desarrollar nuevos tratamientos debido a su potencial y, sobre todo, a su alta disponibilidad y bajo coste. Entre las diferentes especies de hongos, *Agaricus bisporus* es la especie más cultivada y consumida en todo el mundo, siendo por tanto la más estudiada. Sus cualidades nutricionales se conocen desde la antigüedad, ya que presenta un alto contenido de fibra, gran cantidad de vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales, y a su vez, bajo contenido en grasas y colesterol ¹²¹. También es importante su alto contenido en compuestos bioactivos como los complejos proteicos y polisacáridos, β -glucanos y polifenoles. Esta especie de hongo contiene compuestos fenólicos, terpenos, betacarotenos e importantes vitaminas, relacionándose todos estos compuestos con sus propiedades antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias. ¹⁰⁴.

Una de las principales propiedades de los hongos, y, en este caso, de la especie *Agaricus bisporus*, es su función bactericida. Existen metabolitos secundarios de bajo peso molecular como terpenos, esteroides y quinolonas, así como de alto peso molecular, como péptidos y proteínas, que convierten a *Agaricus bisporus* en un agente antimicrobiano ¹²². Al mismo tiempo, diferentes estudios han posicionado a los hongos comestibles como excelentes antioxidantes debido a la presencia de compuestos fenólicos en su composición ¹²³. Estos compuestos bioactivos son beneficiosos en una gran variedad de enfermedades, incluyendo trastornos inmunes e inflamatorios, cáncer, hipertensión, diabetes e hiperlipidemia ¹²⁴.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la enfermedad hepática de diversas etiologías, con el fin último de la búsqueda de nuevos tratamientos selectivos, preventivos y naturales basados en extractos de champiñones. Para ello se han abordado diferentes subobjetivos:

1. Evaluación de los extractos naturales de *Agaricus bisporus* como inhibidores de la replicación del virus de la hepatitis C

- Inicio de la purificación, caracterización e identificación de los compuestos presentes en los extractos de *Agaricus bisporus* con actividad inhibidora de la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C.
- Inhibición de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C de diferentes genotipos.

2. Evaluación de los extractos naturales de *Agaricus bisporus* como moduladores de la fibrosis, estrés oxidativo e inflamación hepática *in vitro*.

- Evaluación de la utilidad de marcadores fibróticos (COL-1 α -1, ACTA-2 α , TPM2 β y GATA4) en células estrelladas hepáticas LX2 tratadas con compuestos de origen natural obtenidos a partir de *Agaricus bisporus*.
- Evaluación de la utilidad de marcadores de estrés oxidativo e inflamación hepática (SOD2, NOS2) en células estrelladas hepáticas LX2 tratadas con compuestos de origen natural obtenidos a partir de *Agaricus bisporus*.

3. Evaluación de los extractos naturales de *Agaricus bisporus* como moduladores de la fibrosis, estrés oxidativo e inflamación hepática en un modelo animal de EHGNA (KO LDLr)

- Evaluación de la utilidad de marcadores fibróticos (COL-1 α -1, GATA4) en un modelo animal de EHGNA (KO LDLr) con dieta alta en grasa.

- Evaluación de la utilidad de marcadores de estrés oxidativo e inflamación hepática (SOD2, NOS2 y MOMA2) en un modelo animal de EHGNA (KO LDLr) con dieta alta en grasa.
- Evaluación de la regulación del peso corporal de ratones EHGNA (KO LDLr) alimentados con dieta alta en grasa y con extractos de champiñones *Agaricus bisporus*.

4. Evaluación del complejo NLRP3 inflamasoma como diana clave en la regulación de la enfermedad hepática (fibrosis, metabolismo lipídico y estrés oxidativo) *in vivo* en un modelo animal KO NLRP3.

- Evaluación de la utilidad de marcadores fibróticos (COL-1 α -1, TPM2 β y GATA4) en un modelo de ratón KO NLRP3.
- Evaluación de la utilidad de marcadores metabólicos (MTP, FASN, DGAT1) en un modelo de ratón KO NLRP3
- Evaluación de la utilidad de marcadores de estrés oxidativo (SOD2, PTPRG) en un modelo de ratón KO NLRP

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Reactivos

Todos los reactivos, kits, anticuerpos y cebadores usados en este estudio han sido de grado análisis, y se describen en las **tablas 2,3 y 4**.

Tabla 2. Anticuerpos para medición de expresión proteica.

Producto	Referencia	Casa comercial
Anticuerpos para expresión proteica		
β -actina antibody	4967	Cell Signaling Technology
Hepatitis C core protein monoclonal antibody (C7-50)	ALX-804-277	Enzo Life Science
Anti-NS3 (JFH-1 Monoclonal Clone 2E3) antibody	HCV-2E3	BioFront Technologies
Goat Anti-Mouse (H+L)- HRP	1721011	BioRad
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	1706515	BioRad
GATA4 (D3A3M) Rabbit antibody	36966	Cell Signaling Technology
COL-1 α -1 antibody	OABB01299	Aviva Systems Biology
TPM2 polyclonal antibody	720307	Thermo Fisher Scientific
PTPRG Polyclonal antibody	PA5-15524	Thermo Fisher Scientific
Anti-MTP/MTP antibody	ab75316	Abcam
Anti-FASN antibody	ab22759	Abcam
Anti-DGAT1 antibody	ab54037	Abcam
Goat anti-rabbit IgG-HRP	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology Inc.
GATA-4 Anticuerpo (G-4)	sc-25310	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-monocyte + macrophage antibody (MOMA-2)	ab33451	Abcam
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel), 3,3'-diaminobenzidine	SK-4100	Vector Laboratories
VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard)	PK-6100	Vector Laboratories
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	ab150115	Abcam
DAPI	28718-90-3	Sigma Aldrich

Tabla 3. Cebadores para medición de expresión génica.

Producto	Referencia	Casa comercial
Cebadores para expresión génica		
Hs_RRN18S_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00199367	QIAGEN
Fwd-CTGTGAGGAACTACTGTCT Rev- CGCCCTATCAGGCAGTACCA		
FH-2 fw/rev Primer		No comercial
Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer assay	QT00079247	QIAGEN
Hs_COL1A1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00037793	QIAGEN
Hs_ACTA2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00088102	QIAGEN
Hs_TPM2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00048720	QIAGEN
Hs_GATA4_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00031997	QIAGEN
Hs_SOD2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT01008693	QIAGEN
Hs_NOS2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00068740	QIAGEN
Mm_Gapdh_3_SG QuantiTect Primer Assay	QT01658692	QIAGEN
Mm_Coll1a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00162204	QIAGEN
Mm_Gata4_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00155400	QIAGEN
Mm_Sod2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00161707	QIAGEN
Nitric oxide synthase 2 primer (mouse)	4331182	TaqMan

Tabla 4. Kits y reactivos utilizados para los diferentes experimentos desarrollados en el estudio.

Producto	Referencia	Casa comercial
Kits y reactivos		
SensoLyte520 HCV Protease Assay Kit	71145	AnaSpec, Inc.
HCV NS3/4A protease genotype 1b, recombinant	AS-61017-5	AnaSpec, Inc.
HCV NS3/4A protease genotype 2a, recombinant	AS-72167-5	AnaSpec, Inc.
HCV NS3/4A protease genotype 3a, recombinant	AS-72168-5	AnaSpec, Inc.
Quercetin	117-39-5	HWI ANALYTIK GmbH
Amaya cell line nucleofector kit T (260 V, 950 μ F Lonza	VC-1002	Bioscience Lonza
COBAS [®] TaqMan [®] HCV Test v2.0	-	Roche Diagnostic
QuantiTect Rev. Transcription Kit	205311	QIAGEN
SensiFAST TM cDNA Synthesis Kit	BIO-65054	Bioline
GoTaq [®] qPCR Master Mix 2x	A6001	Promega
TRIpure Reagent	BIO-38033	Bioline Reagents
RNeasy Lipid Tissue Kit	74804	Qiagen, Hilden, Germany
HEPES	A1069,0250	Applichem
NaCl	A1149,1000	Applichem
EDTA	A3234,0500	Applichem
PMSF	A0999,0025	Applichem
NaF	A0547,0500	Applichem
Na ₃ VO ₄	A2196,0010	Applichem
Protease Inhibitor Cocktail	P8340	Sigma-Aldrich
Nonidet NP-40 (IGEPAL)	A1694,0250	Applichem
DC TM Protein Assay Reagent A	5000113	BioRad
DC TM Protein Assay Reagent B	5000114	BioRad
DC TM Protein Assay Reagent C		
	5000115	BioRad
Precision Plus Protein TM Standards Dual Color	1610374	BioRad
Any kD TM Criterion TM TGX Stain-Free TM Protein Gel, 18 well	5678124	BioRad
Tris-Base pH 8,3 (48 mM)	T1503	SIGMA
SDS (0,0375%)	A2263	AppliChem
Metanol (20% v/v)	179957	SIGMA

Glicina (39 mM)	A4554	AppliChem
Inmuno Blot® PVDF Membranes for Protein Blotting (26c, x 3,3 m 0,2 um)	1620177	BioRad
Extra Thick Western Blotting Filter Paper 20 cm x 20 cm	88620	Thermo Scientific
Albumin (BSA) Fraction V (pH 7.0)	A6588,0100	AppliChem
Tween-20	A4974	AppliChem
Clarity™ Western ECL substrate	170-5061	BioRad
DMEM Low Glucose w/o L- glutamine w/ sodium pyruvate	L0064-500	Biowest
DPBS 1X	14190-144	Gibco (Life Technologies)
Trypsin-EDTA (0,05%) phenol red	25300-062	Gibco ThermoScientific
Sterile-filtered FBS	F7524	Sigma
Penicillin-Streptomycin (100 U/mL)	15140-112	Gibco ThermoScientific
L-glutamine (200 mM)	25030081	Invitrogen Life Technologies
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	11140-035	Gibco ThermoScientific
Trypan Blue	15250-061	Gibco (Life Technologies)
SOD Assay Kit	CA061	Canvax
24(S)-Hydroxycholesterol ELISA Kit	Ab204530	Abcam
Glucose Assay Kit	Ab65333	Abcam

3.2.Preparación y caracterización de extractos de champiñones

3.2.1. Preparación del extracto de *Agaricus bisporus* (AbAEE)

Las variedades de champiñones *Agaricus bisporus* fueron cultivados en el invernadero de la Universidad de Sevilla (CITIUS) de acuerdo con los procedimientos estándar ¹²⁵. Se utilizaron 5 lotes diferentes de champiñones para comprobar la consistencia de los experimentos. Los extractos AbAEE se prepararon a partir de los cuerpos fructíferos, también llamados carpóforos, de los hongos. El procedimiento seguido se muestra en la **figura 11**. Una vez lavados con citrato (2 g/L), se escurrieron y trocearon para añadir a continuación un volumen de agua destilada igual

a su peso en gramos (10 g de champiñón + 10 mL de agua destilada). A continuación, la mezcla se homogeneizó en un homogeneizador tipo aspas. Una vez obtenido el homogenado, se realizó un tratamiento enzimático con una mezcla de enzimas glucanasas y quitinasas (Novo Nordisk ®) con el fin de favorecer la liberación de productos intracelulares. Las condiciones para este tratamiento fueron pH 5, temperatura de 55 °C±1 y una relación enzima-sustrato de 0,01 (E/S=0,01), manteniéndose dichas condiciones durante 24 horas en un biorreactor. Finalizado el tratamiento enzimático, la inactivación de las enzimas se llevó a cabo subiendo la temperatura a 90 °C y manteniéndola durante 120 minutos. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 1 M y se centrifugó a 8000 x g.

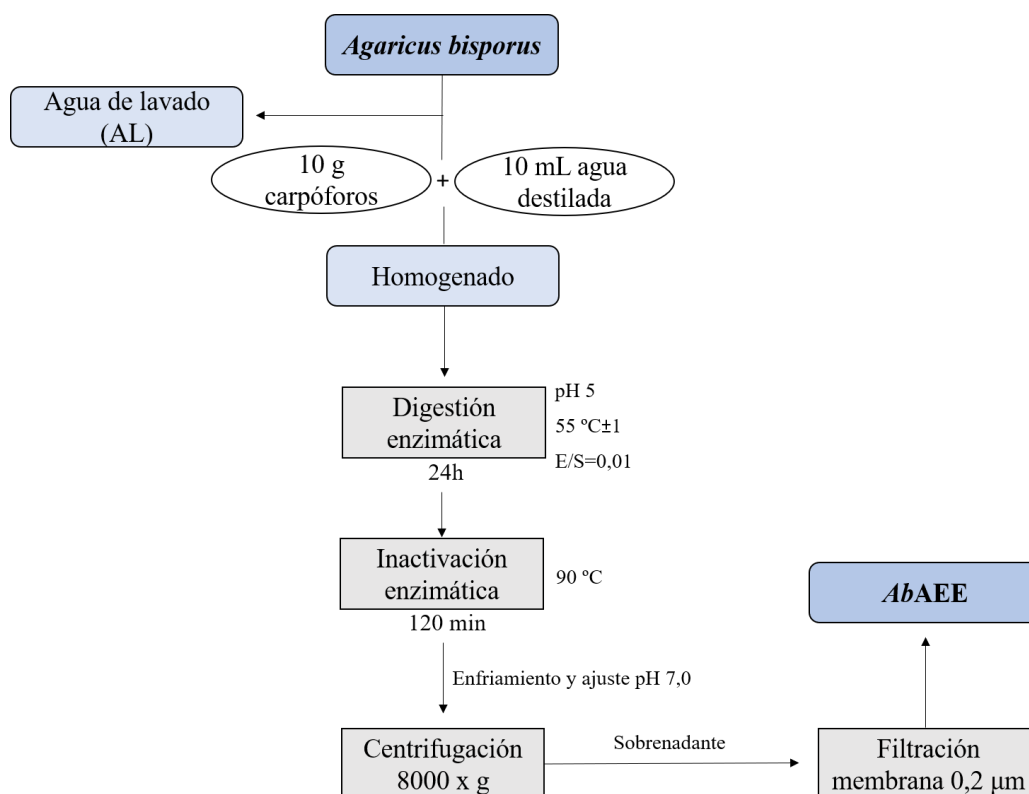


Figura 11. Esquema del proceso de preparación de los extractos AbAEE

Finalmente, para mantener las condiciones de esterilidad, los extractos fueron filtrados mediante filtros estériles comerciales con un tamaño de poro de 0,22 µm, obteniendo el extracto AbAEE.

El proceso de enriquecimiento de los extractos se muestra en la **tabla 5**. El agua de escaldado tras el lavado con citrato se recolectó, denominándose agua de lavado (AL).

Tabla 5. Resultado del procesamiento de la variedad de hongo *Agaricus bisporus*. Peso inicial (g) de material fresco, peso final (g) tras el secado, % de peso seco y volumen de H₂O_d (mL) requerido para una concentración de 42 mg/mL.

Especie hongo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso seco (%)	H ₂ O _d (mL)
<i>A. bisporus</i>	12,91	0,37	2,86	8,81

3.2.2. Fraccionamiento del extracto crudo *AbAEE* para ensayo *in vitro* NS3/4A del VHC

El extracto crudo *AbAEE* fue fraccionado por dos métodos distintos: ultrafiltración por tamaño y fraccionamiento químico por extracción secuencial líquido-líquido.

El fraccionamiento bruto de *AbAEE* por ultrafiltración se llevó a cabo utilizando membranas de ultrafiltración con diferentes cortes nominales: 100 kDa, 20 kDa y 3 kDa. Las membranas de ultrafiltración utilizadas se obtuvieron de Amicon (Bedford, MA, USA) y Pall (Ann Arbor, MI, USA). El extracto *AbAEE* se ultrafiltró a través de una membrana de ultrafiltración de 100 kDa, obteniendo el pre-UF-100; el pre-UF-100 se filtró a través de una membrana de ultrafiltración de 20 kDa, obteniendo el pre-UF-20, y, finalmente, el pre-UF-20 se filtró a través de una membrana de ultrafiltración de 3 kDa, obteniendo el pre-UF-3. Cada una de las fracciones (5 mL) se concentraron hasta 0,5 mL por evaporación al vacío en un rotavapor (Büchi, Zurich, Suiza). El secado de cada una de las fracciones concentradas se realizó por liofilización, haciendo uso de un liofilizador (Telstar, Terrasa, Barcelona). Las fracciones pre-UF-100, pre-UF-20 y pre-UF-3 liofilizadas se disolvieron en un volumen de agua (mL) requerido para obtener una concentración de 5 mg/mL, obteniendo las fracciones UF-100, UF-20 y UF-3.

El segundo fraccionamiento se realizó mediante ELL secuencial utilizando tres disolventes (hexano, diclorometano y acetato de etilo) caracterizados por tener diferentes índices de polaridad (pI), todos ellos inmiscibles en agua, según el procedimiento descrito por Delgado-Povedano ¹²⁶. Este procedimiento sólo se realizó para la fracción UF-3 obtenida en el fraccionamiento anterior por ultrafiltración. La fracción UF-3 se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos tras la adición de cada uno de los disolventes (volumen de 5 mL), obteniendo cada una de las fases o extractos (5 mL) de hexano, diclorometano, acetato de etilo y fracción acuosa. Del mismo modo que en el fraccionamiento por ultrafiltración, se procedió a la concentración de dichas fracciones hasta un volumen de 0,5 mL, por evaporación al vacío en un rotavapor (Büchi, Zurich, Suiza). El secado de cada una de las fracciones concentradas se realizó por liofilización, haciendo uso de un liofilizador (Telstar, Terrasa, Barcelona). Las fracciones obtenidas ya liofilizadas se disolvieron en un volumen de agua (mL) requerido para obtener una concentración de 5 mg/mL, obteniendo las fracciones de hexano (HF-3 kDa), de diclorometano (DMF-3 kDa), de acetato de etilo (AEF-3 kDa) y fracción acuosa (AcF-3 kDa). Este segundo fraccionamiento se llevó a cabo en colaboración con la Prof. Dra. María Dolores Luque de Castro, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba (Campus Universitario de Rabanales).

3.2.3. Análisis químico de las diferentes fracciones de *AbAEE*

La composición de los diferentes extractos fue analizada en colaboración y según el procedimiento descrito por Delgado-Povedano ¹²⁶. Para ello se hizo uso de un sistema de cromatografía líquida (serie Agilent 1200; Santa Clara, CA, EE. UU.) acoplada a un espectrómetro de masas (Agilent 6540 UHD Accurate-Mass QTOF; Santa Clara, CA, EE. UU.). Este equipo emplea una fuente de doble ionización por electropulverización para la pulverización simultánea de una solución de masa conocida y monitorización continua de las relaciones m/z detectadas. Las fracciones UF-3, obtenida por ultrafiltración, AqF-3 kDa, obtenida por ELL, y las fracciones orgánicas HF-3

kDa, DCM-3 kDa y EAF-3 kDa. obtenidas también por ELL, fueron sometidas a dicho análisis químico por LC/MS-QTOF para la identificación de los diferentes elementos que las componen.

3.3. Líneas celulares y técnicas de cultivo celular

Para abordar este estudio se utilizaron dos líneas celulares diferentes: línea celular Huh- 7.5 derivada de hepatoblastoma humano y línea celular LX2 de células estrelladas hepáticas humanas en estado activo.

3.3.1. Línea celular de hepatoma humano Huh7.5

La línea celular Huh-7.5 es una variante de la línea celular Huh-7, la cual deriva de un carcinoma celular originalmente aislado de un tumor de hígado de un hombre japonés de 57 años, en 1982¹²⁷. Esta variante presenta una mutación en el gen I inducible de ácido retinoico citosólico (RIG-I), lo cual favorece la transfección y replicación del VHC. Es una línea inmortal de células tumorigénicas con una morfología similar a las células epiteliales.

3.3.2. Línea celular estrellada hepática LX2

Por su parte, la línea celular LX2 son células aisladas de lipocitos hepáticos (o células estrelladas o de Ito) y células de Kupffer de un hígado humano normal, las cuales son inmortalizadas por la transfección del plásmido pRSTaf que codifica el antígeno TSV40 bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR). Esta línea celular presenta un metabolismo de fibrogénesis que la hace altamente adecuada para el estudio de la fibrosis hepática humana¹²⁸.

3.3.3. Generalidades para el cultivo celular

Durante todo el proceso se mantuvieron estrictas condiciones de esterilidad. Todo aquel material que no hubiera sido preparado en una cabina de flujo laminar fue esterilizado mediante filtros estériles comerciales con tamaño de poro de 0,22 μm . Todo el material de plástico usado, pipetas serológicas, placas de pocillos, botellas de cultivos y tubos de tipo Falcon era material desechable. Las puntas de pipeta y otros materiales de plástico como micro-tubos de 1,5 mL fueron

autoclavados. Finalmente, todas las manipulaciones fueron realizadas en el interior de una campana de flujo laminar vertical. En general, los cultivos celulares fueron mantenidos en una estufa de cultivo celular a una temperatura constante de 37°C, a una atmósfera de 95 % de aire, 5 % de CO₂ con humedad saturada.

3.3.4. Descongelación de células

El pellet de células, tanto de la línea Huh-7.5 como LX2, fue previamente almacenado en condiciones óptimas, a una temperatura de -80°C y en crioviales suplementados con Criomax®. Para realizar el cultivo de células, fueron descongeladas. Dicho proceso de descongelación se realizó en un baño calentado previamente a 37°C. Se hizo una dilución 1:10 del precipitado celular con medio DMEM con bajo nivel de glucosa (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Biowest®), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen®), 100 U/mL penicilina y 100 U/mL estreptomicina (Gibco®), además de aminoácidos no esenciales 100X (Gibco®). Tras homogeneizarlo, se centrifugó a 200 x g durante cinco minutos a temperatura ambiente (25°C). El sobrenadante fue desechado y el precipitado de células se resuspendió en medio de cultivo DMEM suplementado. Las células fueron contadas y se distribuyeron en botellas o *flask* de cultivo de 75 cm² (Sarsted®), incubándose finalmente a 37°C, 5 % de CO₂.

En función de la línea celular, éstas pueden crecer con una confluencia determinada. Las Huh-7.5 no pueden crecer con más de un 70 % de confluencia, ya que de lo contrario comenzarían un proceso de diferenciación. Por ello, para el mantenimiento de las células hasta la puesta en marcha de los experimentos, se realizaron cambios de medios y pases sucesivos controlando la viabilidad celular, morfología y confluencia.

3.3.5. Preparación de la línea celular para su uso

Para los distintos pases de ambas líneas celulares, se procedió, en primer lugar, a retirar el medio de cultivo de las botellas. Seguidamente las células se lavaron dos veces con DPBS 1X

(*Dulbecco's Phosphate-buffered saline*) (Gibco®), para ser levantadas de la superficie por la adición de 1,5 mL de tripsina a 37°C y 5 % de CO₂ durante cinco minutos. Finalizado el tiempo, se neutralizó el efecto de la tripsina-EDTA (Gibco®) con la adición de medio de cultivo suplementado (contiene SBF para dicha neutralización). Con ayuda de una pipeta serológica, fueron transferidas a un tubo de tipo Falcon de 15 mL para ser centrifugadas a 200 x g durante cinco minutos y a temperatura ambiente (25°C).

A continuación, el sobrenadante fue desechado y el precipitado se resuspendió en un volumen de medio de cultivo DMEM suplementado equivalente al número de células necesario para cada experimento, ya que antes de la siembra, las células fueron contadas. Finalmente, el homogenado celular fue sembrado en placas de 6 pocillos (M6) (Sarsted®) para los diferentes experimentos, y en botellas o *flask* de cultivo de 75 cm² para el mantenimiento de las líneas celulares. En ambos casos, los cultivos celulares se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂. Todo el proceso fue realizado bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical.

3.3.6. Conteo celular

El conteo celular se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Esta cámara es una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. La porción central, zona donde se realiza el conteo, está dividida en tres partes, donde se encuentra grabada una retícula cuadrangular de 3 mm x 3 mm de lado y subdivida a su vez en nueve cuadrados de 1 mm de lado cada uno.

La cámara fue lavada con agua destilada (H₂O_d) y etanol 96 % antes de colocar un cubreobjetos sobre ella de manera que cubriese su parte central. De la muestra de células previamente preparadas y homogeneizadas, se pipeteó 20 µl del homogenado celular + 20 µl de azul de tripán, tomando finalmente 10 µl de mezcla que, por capilaridad, penetra entre la cuadrícula y el cubreobjetos cubriendo toda la cuadrícula. El azul de tripán es un colorante azoico que tiñe las

células muertas, pudiendo diferenciarlas de las vivas. A continuación, se procedió al conteo de las células en el microscopio (Leica DM IL HC), utilizando un objetivo de 10X. Se contó el número de células vivas existentes en los cuadrantes externos y central, calculando el promedio. Para calcular el número de células totales, se aplicó la siguiente fórmula:

- Células/ mL= (promedio) x (10.000) x (2); siendo 10.000 el factor de conversión de la cámara; y siendo 2 el factor de dilución del azul de tripán. El resultado es el número de células que se tienen por mL.

- El número total de células se calculó multiplicando el resultado obtenido por mL por el volumen total de la muestra (mL).

3.4. Infección de células Huh7.5 por VHC. Producción de partículas virales

La producción de partículas virales de VHC se llevó a cabo usando el método de electroporación con 5 µg de ARN transcrito de longitud completa de la cepa JFH1 (genotipo 2a)³³ a células Huh7.5 (3x10⁶ células). Para ello se utilizó el kit *Cell Line NucleofectorTM* (260 V, 950 µF Lonza). Tras un período de tiempo de 72 horas, se recolectó el sobrenadante del cultivo, se filtró a través de membranas de difluoruro de polivinilideno (0,45 µm de tamaño de poro), y se tituló, finalmente, infectando a células Huh7.5 sanas con diluciones en serie. Las células se fijaron con metanol a -20°C para hacer una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-VHC core (C7/50) (Enzo Life Science) y comprobar la presencia de las partículas virales. Se utilizaron reservas virales de alta carga para inocular células Huh7.5 a una multiplicidad de infección (MOI, del inglés *multiplicity of infection*) de 1. Para ello, se inocularon células Huh7.5 con partículas JFH1-VHC durante un período de 6 horas a 37°C, período tras el cual se retiró el inóculo para realizar los distintos ensayos experimentales.

La producción de partículas virales de VHC se realizó en colaboración con la doctora M^a de los Ángeles Rojas Álvarez-Ossorio, del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

3.5.Tratamiento de líneas celulares con extractos de *Agaricus bisporus*

3.5.1. Ensayos para determinar los efectos citotóxicos del extracto de *Agaricus bisporus* en células

Para determinar los posibles efectos citotóxicos del extracto de *Agaricus bisporus* sobre las líneas celulares Huh7.5 y LX2, se realizó un ensayo de viabilidad con azul de tripán para determinar el número de células muertas vs las células vivas. En primer lugar, se examinó la morfología y el crecimiento celular bajo el microscopio, seguido de un conteo de células vivas y muertas. Para ello, ambas líneas celulares fueron tratadas con la siguiente batería de concentraciones de AbAEE: 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL y 0,2 mg/mL.

3.5.2. Tratamiento de Huh7.5 con extractos de *Agaricus bisporus* y quercetina

Para los experimentos *in vitro* de análisis de la capacidad de AbAEE para inhibir la replicación del VHC, se utilizaron células Huh7.5 inoculadas con JFH1-VHC. Se cultivaron células Huh7.5 infectadas (50.000 células por pocillo en placas M6) con medio DMEM suplementado, como se indica en el apartado 3.3.5. Las células fueron tratadas con diferentes compuestos durante un período de 72 horas: extracto AbAEE (0,2 mg/mL), quercetina (50 μ M). Las concentraciones fueron elegidas en base a la prueba de toxicidad para AbAEE y a las recomendaciones de autores para la quercetina.

La infección de Huh7.5 con partículas virales JFH1-VHC y el tratamiento con AbAEE y quercetina se realizó en colaboración con la doctora M^a de los Ángeles Rojas Álvarez-Ossorio, del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

3.5.3. Tratamiento de células LX2 con extractos de *Agaricus bisporus*

Para los experimentos *in vitro* de evaluación de parámetros fibróticos, inflamatorios y de estrés oxidativo, se cultivaron células estrelladas hepáticas en estado activo (LX2) (10⁶ células por pocillo en placas M6) con medio DMEM suplementado, como se indica en el apartado 3.3.5. Las

células LX2 fueron tratadas con extractos *AbAEE* a concentraciones de 0,2 mg/mL y 1 mg/mL durante un período de tiempo de 24 horas. Las concentraciones fueron elegidas en base a la prueba de toxicidad para *AbAEE*.

3.6. Modelos animales

Los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2010/63 / UE) y las regulaciones españolas correspondientes para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos (RD 53/2013 sobre el cuidado de animales experimentales). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de cuidado animal institucional local.

Los experimentos con modelos animales se realizaron en colaboración con el doctor Mario David Cordero Morales (Universidad de Sevilla) para aquel modelo KO NLRP3, y con los doctores Francisco Manuel Martín Bermudo y Amparo Luque Sierra (CABIMER, Sevilla), para aquel modelo KO LDLr. Los ensayos de toxicidad en ratas se realizaron en colaboración con el doctor Juan D. Bautista Palomas.

3.6.1. Ensayos para determinar los efectos citotóxicos del extracto de *Agaricus bisporus* en animales

Para determinar los posibles efectos adversos que podrían existir debido a la administración oral del extracto de *AbAEE*, se realizó una prueba de toxicidad aguda (TA) en ratas basada en las evaluaciones biométricas de los animales al tratarlos con dosis fijas de *AbAEE*. Este estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2010/63 / UE) y las regulaciones españolas correspondientes para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos (RD 53/2013 sobre el cuidado de animales experimentales). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de cuidado animal institucional local. Para el ensayo se utilizaron ratas Wistar ($n=40$)

criadas y caracterizadas en el Laboratorio Charles River (Wilmington, Massachusetts, Estados Unidos), las cuales fueron alojadas en una instalación específica para animales libres de patógenos. Al inicio del estudio, las 40 ratas se dividieron de manera aleatoria en cuatro grupos: un grupo de control (TA-0) y tres grupos tratados (TA-I a III). Cada grupo estaba compuesto por 10 ratas, 5 por sexo (**Tabla 6**).

Tabla 6. Distribución de los grupos de ratas controles y los grupos tratados con *AbAEE* por sexo y dosis del extracto, para el estudio preliminar de toxicidad de *AbAEE*. TA-0= Toxicidad aguda en el grupo control tratado con agua (10 mL/kg de peso corporal). TA I/II/III= Toxicidad aguda en los grupos tratados con 300, 2000 y 5000 mg/kg *AbAEE*, respectivamente.

Grupo:	TA-0	TA-I	TA-II	TA-III
n	10	10	10	10
Macho	5	5	5	5
Hembra	5	5	5	5
Dosis (mg/kg)	0	300	2000	5000

Tras un ayuno de un período de 12 horas, se administró por vía oral (sonda) una única dosis de 300, 200 o 5000 mg/kg de peso corporal de *AbAEE* disuelto en 3 mL de agua (grupos TA-I, TA-II y TA-III, respectivamente). El grupo control (TA-0) se trató con un volumen de agua de 10 mL/kg de peso corporal de la rata. Después de la administración de las dosis establecidas, se permitió a las ratas el acceso libre a dieta y agua. Durante una hora tras el tratamiento inmediato, y de forma intermitente a las 4, 8 y 24 horas, se observaron los cambios de comportamientos, síntomas tóxicos y muertes en cada uno de los grupos. Las observaciones siguieron hasta 14 días consecutivos. Los pesos corporales se midieron los días 1, 7 y 14 tras el tratamiento. La ingesta de alimentos y agua se registró cada dos días. Todos los grupos de animales se sometieron a necropsia general y examen macroscópico.

3.6.2. Modelo animal KO LDLr

3.6.2.1. *Diseño experimental*

Se utilizaron ratones hembra transgénicos del receptor LDL ($LDLr^{-/-}$, cepa C57BL / 6J, $n=20$, con edades comprendidas entre 16 y 17 semanas), adquiridas en el Laboratorio Jackson (002207, Bar Harbor, Maine). Los ratones hembra fueron divididas aleatoriamente, y al inicio del estudio, en cuatro grupos: dos grupos recibieron una dieta estándar baja en grasas (LFD, del inglés *low fat diet*, 13 kcal % de grasa, 20 kcal % de proteína y 67 kcal % de carbohidratos, 11,8 kJ / g, dieta de mantenimiento de roedores Teklad 2014S, Harlan Laboratories) sin extracto de *AbAEE* en la dieta (LFD, $n= 5$) y con extracto de *AbAEE* en la dieta (LFD+AB, $n=5$). Los otros dos grupos fueron alimentados una dieta alta en grasa (HFD, del inglés *high fat diet*,) basada en manteca de cerdo; una dieta contenía un menor porcentaje de grasa (45 kcal % de grasa, 15 kcal % de proteína y 40 kcal % de carbohidrato, 15,7 kJ / g) sin extracto de *AbAEE* en la dieta (HFD45, $n=5$), y la otra dieta contenía un mayor porcentaje de grasa (60 kcal %, 10 kcal % de proteína y 30 kcal % de carbohidratos, 21,0 kJ / g) y con extracto de *AbAEE* (HFD60 + AB). Los grupos LFD y HFD45 sin extracto de *AbAEE* constituyeron los grupos controles, mientras que LFD+AB y HFD60+AB fueron los grupos tratados o experimentales. Los diferentes grupos de ratones tuvieron acceso libre a dieta y agua. La composición de las dietas experimentales se muestra en la **tabla 7**.

Tabla 7. Composición de macronutrientes de las dietas experimentales de los ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*).

	LFD control	LFD + AB	HFD45	HFD60 + AB
Contenido energético (kJ/g)	11,8	11,8	15,7	21,0
Carbohidratos (w/w)	48	48	39	39
Proteínas (w/w)	14	14	12	12
Lípidos (w/w)	4	4	19	33
<i>AbAEE</i> *	--	7,5	--	7,5
Ingesta calórica total				
Carbohidratos (kcal%)	67,6	67,6	41,6	31,1
Proteínas (kcal%)	19,7	19,7	12,8	9,6
Lípidos (kcal%)	12,7	12,7	45,6	59,3

*El extracto de *AbAEE* fue suplementado en el agua, añadiendo 7,5 g/kg peso de en las botellas de agua potable tres veces por semana.

Los ratones se alojaron en una instalación específica para animales libre de patógenos, con una temperatura de entre 20-22°C y una humedad relativa del 30-70 %.

Las dosis de extracto de *AbAEE* se administraron en las botellas de agua potable de acuerdo con el peso de los ratones (7,5 g/kg de ratones), y la cantidad promedio de extracto de *AbAEE* que consumieron los ratones fue de 1,26 mg/mL (6,28 mg/día) . Tras un tiempo de 12 semanas, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y se sacrificaron para recoger el hígado. Los tejidos del hígado se fijaron durante 12 horas con paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina.

3.6.2.2. Parámetros biológicos

Se midieron los pesos corporales de los ratones y se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola cada 15 días durante las 12 semanas de intervención nutricional. Las concentraciones de glucosa en sangre se midieron utilizando un glucómetro automático (Accu-Chek® Aviva System, Roche, Indianapolis, IN, EE. UU.). Para determinar la función hepática, se realizó una actividad sérica de aspartato aminotransferasa (GOT / AST) con un Reflotron®Plus (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, Reino Unido), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

3.6.3. Modelo animal KO NLRP3

3.6.3.1. Diseño experimental

Se utilizaron ratones macho transgénicos del complejo NLRP3 ($NLRP3^{-/-}$, cepa C57BL/6J, $n=2$, de edad comprendida entre las 15 y 16 semanas) y ratones macho controles (WT, del inglés *Wild Type*) (cepa C57BL/6J, de 15 semanas, $n=2$, de edad comprendida entre las 15 y 16 semanas). Los ratones se adquirieron en el Laboratorios Jackson (000664, Bar Harbor, Maine) . Su peso osciló entre 25-30 gramos, y se mantuvieron en un ciclo regular de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los grupos tuvieron acceso *ad libitum* a la dieta prescrita y al agua durante todo el estudio. Los ratones se alojaron en una instalación específica para animales libre de patógenos, con una temperatura de entre 20-22°C y una humedad relativa del 30-70 %. Los ratones se mantuvieron en estas condiciones durante diferentes períodos de tiempo para la formación de dos grupos de ratones: ratones jóvenes (WT JO y $NLRP3^{-/-}$ JO) durante un tiempo de 3 meses, y ratones viejos (WT VJ y $NLRP3^{-/-}$ VJ) durante un tiempo de 20 meses. Tras un tiempo de 3 o 20 meses, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y se sacrificaron para recoger el hígado. Los tejidos del hígado se fijaron durante 12 horas con paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina.

3.6.3.2. *Parámetros biológicos*

El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron semanalmente. Los niveles de colesterol y de glucosa se analizaron por duplicado utilizando kits comerciales ELISA (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

3.7. Ensayo fluorimétrico proteasa NS3/4A del virus de Hepatitis C

Se realizó un ensayo fluorimétrico usando el kit de ensayo de proteasa SensoLyte® HCV, AnaSpec® (Fremont CA, EE. UU.). Este kit contiene sustrato de proteasa NS3/4A de VHC, 5-FAM, que es un estándar de referencia de fluorescencia Ex/Em=490 nm/520 nm tras la escisión, tampón de ensayo, DTT y solución de parada. Las proteasas del virus de la hepatitis C NS3/4A (genotipos 1b, 2a y 3a) se obtuvieron de AnaSpec (10 µL disuelto en 50 µL de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 20 % de glicerol, KCl 100 mM, DTT 1 mM y EDTA 0,2 mM, concentración: 0,2 mg/mL).

El kit de ensayo de proteasa SensoLyte® 520 HCV proporciona un ensayo conveniente para la detección de alto rendimiento de los inhibidores de la proteasa NS3/4A del VHC y para la cuantificación continua de la actividad de la proteasa NS3/4A del VHC utilizando una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia 5-FAM / QXL™ 520 (péptido de FRET). La secuencia de este péptido de FRET se deriva del sitio de escisión de NS4A/NS4B. En el péptido FRET, la fluorescencia de 5-FAM se detiene mediante QXL™ 520. Tras la escisión en dos fragmentos separados por la proteasa NS3/4A del VHC, se recupera la fluorescencia de 5-FAM, y puede monitorizarse a una velocidad de excitación / emisión = 490 nm /520 nm (**Figura 12**).

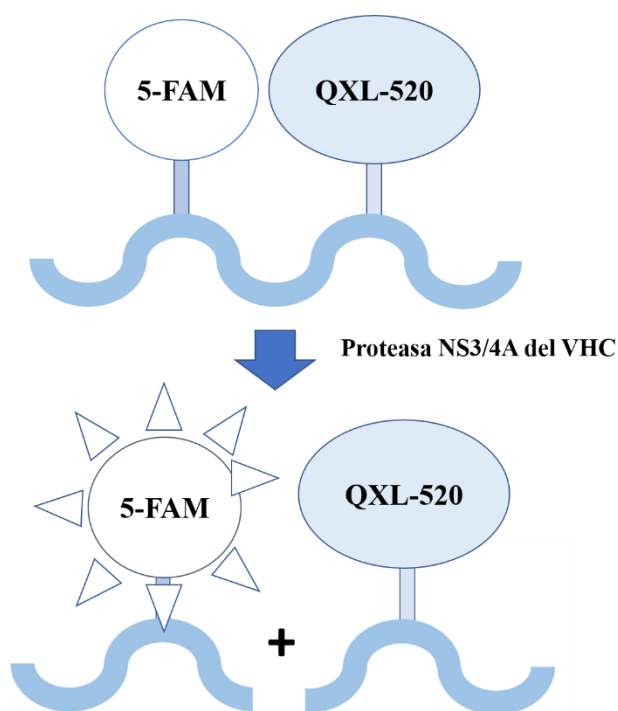


Figura 12. Esquema del funcionamiento del kit fluorimétrico AnaSpec® de la actividad proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C (VHC).

Las diferentes soluciones se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (AnaSpec® Kit NS3/4A proteasa), y las muestras se analizaron en microplacas opacas negras. El ensayo de inhibición del extracto *AbAEE* bruto y las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración y ELL se analizaron utilizando 20 μL de muestra con 22,5 μg de producto/ μL por ensayo. Se utilizó TPV 0,5 mM como control positivo, y muestras E+S sin inhibidores (100 % actividad NS3) como control negativo. Para este ensayo se utilizó la proteasa NS3/4A del VHC de tres genotipos diferentes (1b, 2a y 3a). El ensayo de actividad se realizó en un lector de microplacas de fluorescencia (Synergy Biotek, VT, EE. UU.) A $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

3.8.Extracción de ADN total con TRISURE™

3.8.1. Extracción de ADN de homogenado celular de Huh7.5 infectadas con VHC y de LX2

El análisis de la expresión de los diferentes genes de interés requiere la extracción del ARN de las células cultivadas (Huh-7.5 y LX2) sometidas a los tratamientos ya especificados en apartados anteriores. Tras un período de 72 horas (Huh7.5) o de 24 horas (LX2), se procedió a la extracción de ARN mediante el uso del reactivo TRIsure™ (tiocianato de guanidina). Para ello, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo de cultivo, lavando con PBS y añadiendo 500 µL TRIsure en una campana de extracción de gases. Una vez se obtuvo una solución homogénea, la mezcla se traspasó a tubos eppendorf y se añadió un volumen de 100 µL de cloroformo. A continuación, se agitó vigorosamente en vórtex y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C en una microcentrífuga. De esta manera se obtuvieron dos fases: una fase acuosa que contenía el ARN, y la parte orgánica que contenía las proteínas y el ADN. En una campana de extracción de gases se retiró la fase acuosa, obteniendo aproximadamente 250 µL, y se traspasó a nuevos tubos eppendorf. A la fase acuosa se añadieron 250 µL de isopropanol y se dejó incubar 20 minutos en frío (4°C). Se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C y el precipitado se lavó con EtOH al 75 % en H₂O-DEPC. Se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos y 4°C y el precipitado se resuspendió en 30 µL de H₂O-DEPC. Finalmente, cada muestra se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ((Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas para evitar posible contaminación de ARN, tanto con impurezas orgánicas como inorgánicas (fenol, cloroformo). El grado de pureza de ARN se determinó con la relación de absorbancia de A260/280 y A260/230, que debía ser =1,8. Las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

3.8.2. Extracción de ADN de homogenado tisular hepático de ratones KO

LDLr

El ARN del homogeneizado de tejido hepático de ratón KO LDLr se extrajo de los tejidos hepáticos incluidos en parafina con el kit de tejido lipídico RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). La cantidad de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop. La calidad del ARN se evaluó con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

3.9. Transcripción inversa

El ARN es un material extremadamente sensible a la contaminación por ribonucleasas, enzimas que hidrolizan y degradan el ARN sin necesidad de cofactores para su función, además de que soportan los métodos estándar de inactivación de proteínas. Debido a esta sensibilidad, se procedió a realizar una transcripción inversa o retrotranscripción con el objetivo de obtener ADNc.

Se partió de muestras con 0,1 µg de ARN para obtener 30 µL de ADNc mediante el proceso de transcripción reversa o retrotranscripción (RT). Para ello se utilizó el *SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit* (Bioline®). Para cada muestra de ARN, se preparó una mezcla de volumen final de 10 µL (Oligo (dT), dnTP, Random Hexamer y ARN extraído de la muestra celular o tisular) según instrucciones del fabricante. Cada una de las muestras con el ARN incorporado fue incubada a 65°C durante 10 minutos, tiempo tras el cual se pasó a hielo durante 2 minutos. Cada muestra con ARN fue complementada con 10 µl de la mezcla de reacción, la cual fue preparada según instrucciones del fabricante (RT buffer, inhibidor de RNasa y retrotranscriptasa). Finalmente, la mezcla fue incubada a 40°C durante 45 minutos, y a 70°C durante 15 minutos. Las muestras se mantuvieron en hielo para proceder a la cuantificación por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop. El grado de pureza de ADN se determinó con la relación de absorbancia de A260/280 y A260/230, que debía ser =2, aproximadamente. Finalmente, todas las

muestras se igualaron a una concentración de 100 ng/ μ L diluyendo con H₂O ultrapura Milli-Q. Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

3.10. Extracción de proteínas

3.10.1. Extracción de proteínas de homogenado celular de Huh7.5 infectadas con VHC y de LX2

El análisis de expresión proteica de las diferentes proteínas de interés también requiere la extracción de proteínas de las células (Huh-7.5 y LX2) sometidas a los tratamientos ya especificados en apartados anteriores. Tras un período de 72 horas (Huh7.5) o de 24 horas (LX2), se procedió a la extracción de ADN mediante una solución de lisis casera que incluía HEPES 50 mM (Applichem), pH 7,5, EDTA 5 mM (Applichem), NaCl 150 mM (Applichem), 4 % nonilfenil-poli-etilenglicol (Nonidet NP-40 (IGEPAL)), cóctel comercial de inhibidores de la proteasa (CIP, Sigma-Aldrich), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF, Applichem), fluoruro de sodio 1 mM (NaF, Applichem) y ortovanadato de sodio 1 mM (Na₃VO₄, Applichem). Se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y tras un lavado con PBS, se añadieron 200 μ L de solución de lisis casera por pocillo. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo haciendo uso de un reactivo de ensayo para la cuantificación proteica (DC™ Protein Assay Reagent, BioRad).

3.10.2. Extracción de proteínas de homogenado tisular hepática de ratones KO NLRP3

La extracción de proteínas del homogenado tisular hepático de los ratones KO NLRP3 (grupos controles WT y *NLRP3*^{-/-}) se llevó a cabo haciendo uso de la misma solución de lisis que para las células. En este caso, se pesó 1 mg de tejido hepático que se homogeneizó con 200 μ L de solución de lisis de manera manual y haciendo uso de homogeneizadores de plástico esterilizados. A

continuación, la cuantificación proteica, separación de proteínas, transferencia e incubación con anticuerpos se realizó del mismo modo que para los homogenados obtenidos de células.

3.11. Análisis de expresión génica en células LX2 y tejidos hepáticos: PCR

Para cuantificar pequeñas cantidades de ARN y detectar la expresión génica de varios genes marcadores se utilizó la técnica de RT-qPCR con las muestras de ADNc previamente preparadas. Esta técnica permite amplificar un fragmento de ADN que queda delimitado entre 2 oligonucleótidos con secuencia complementaria a los ácidos nucleicos diana seleccionados. El producto de amplificación se detecta a medida que se va produciendo el ciclo, siendo más sensible y rápida que la PCR clásica.

Toda PCR precisa de un gen no modulable, con expresión constante e independiente del estado patológico de la célula, conocido como gen *Housekeeper*, y necesario para el proceso de normalización de la expresión del gen objetivo y el control. En este caso, y tras probar varios genes controles, se determinó como gen constitutivo el GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La reacción se llevó a cabo con 100 ng de ADNc ajustados a 1 µL en un paso previo, 1 µL del cebador específico para gen, 3 µL de H₂O ultrapura Milli-Q y 5 µL de la mezcla *GoTaq® qPCR Master Mix 2X* (Promega®), para cada muestra y pocillo de la placa. La reacción se llevó a cabo en el software *Eco Real-time PCR System v3.0* del termociclador (Illumina® California, EEUU). Las condiciones de la RT-qPCR fueron 10 minutos a 95°C para la activación de la ADN polimerasa, 10 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 65°C para el alineamiento y 15 segundos a 72°C para la extensión.

Una vez obtenidos los valores del ciclo umbral (Ct) de cada muestra, se cuantificó la variación relativa en la expresión génica mediante el método de comparación de Ct usando la fórmula aritmética desarrollada por Pedersen, 2001:

Variación en los niveles de expresión = $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$

- $\Delta Ct = Ct \text{ problema} - Ct \text{ control interno}$

- $\Delta (\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ situación experimental} - \Delta Ct \text{ situación control.}$

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

La técnica RT-qPCR fue utilizada para la medición de expresión génica de varios marcadores para los diferentes experimentos realizados. De este modo, y en ensayos *in vitro* con células LX2 tratadas con AbAEE, se midieron los genes *Col-1 α -1* (QIAGEN), *Acta-2 α* (QIAGEN), *Tpm2 β* (QIAGEN), *Gata4* (QIAGEN), *Sod2* (QIAGEN) y *Nos2* (QIAGEN). En los ensayos *in vivo* con el modelo animal KO LDLr, se analizó la expresión génica de los marcadores *Col-1 α -1* (QIAGEN), *Gata4* (QIAGEN), *Sod2* (QIAGEN) y *Nos2* (QIAGEN).

3.12. Determinación de los niveles de ARN y proteínas del VHC en células Huh7.5 infectadas con VHC

Tras los ensayos de infección por VHC en células Huh7.5, detallados en el apartado 3.4., se llevó a cabo un análisis de expresión génica de ARN y un ensayo de replicación en dicha línea celular infectada. La replicación del genoma del VHC se evaluó midiendo los niveles intracelulares del ARN del VHC de cadena negativa utilizando una técnica de RT-qPCR específica del transcrito de ARN JFH1 (genotipo 2a) ¹²⁹. Para la cuantificación de ARN de VHC en los sobrenadantes de los cultivos celulares filtrados a las 72 horas de la infección, se utilizó un kit comercial estándar para ensayos de carga viral (COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0, Roche Diagnostic).

3.13. Análisis de expresión proteica en células Huh7.5 infectadas con VHC, células LX2 y tejidos hepáticos: WESTERN-BLOT

Para el análisis de expresión proteica de los diferentes marcadores de interés, y tras la cuantificación de proteínas de los homogenados celulares y tisulares (detallado en los apartados 3.10.1 y 3.10.2.), las proteínas (50-100 μ g) se separaron mediante un gel de proteínas Any kD™ Criterion™ TGX Stain-Free™, 18 pocillos, 30 μ L (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) y se

transfirieron a membranas de PVDF (BioRad). Las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios comerciales, los cuales serán detallados en un apartado posterior para los diferentes experimentos, que se acoplaron a la peroxidasa de rábano o HRP (del inglés *horseradish peroxidase*) para revelar el contenido de proteína mediante el sustrato Clarity™ Western ECL (BioRad). Las imágenes se analizaron en un sistema de imágenes táctiles ChemiDoc™. El sistema ChemiDoc utiliza la cantidad de proteínas como control de carga, evitando el uso de una proteína control adicional como la albúmina. Este sistema, además, parece ser más fiable que los convencionales¹³⁰. Aun así, y puntualmente en los experimentos realizados con muestras de homogenado celular Huh7.5 infectadas con partículas de VHC, se llevó a cabo el método convencional usando la proteína β -actina como proteína control.

La técnica Western Blot fue utilizada para la medición de expresión proteica de varios marcadores para los diferentes experimentos realizados. De este modo, y en ensayos *in vitro* con células Huh7.5 infectadas con partículas de VHC y tratadas con quercetina y con AbAEE, se analizó la expresión de los marcadores proteicos del CORE del VHC (Enzo Life Scientific) y de la proteasa NS3/4A del VHC (BioFront Technologies). Como proteína control se utilizó a β -actina citoplasmática (Cell Signaling).

Para los ensayos *in vitro* con células LX2 tratadas con AbAEE, se midieron los marcadores proteicos COL-1 α -1 (Abcam) y GATA4 (Cell Signaling). Por su parte, y los ensayos *in vivo* realizados en el modelo animal KO NLRP3 (grupos controles y grupos *NLRP3*^{-/-}), se analizaron los marcadores COL-1 α -1 (Abcam), TPM2 β (Thermo Fisher Scientific), GATA4 (Cell Signaling), MTP (Abcam), FASN (Abcam), DGAT1 (Abcam), SOD2 (Abcam) y PTPRG (Thermo Fisher Scientific).

Para los distintos experimentos con células, y como ya se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se obtuvieron comercialmente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron *Goat-antimouse* (BioRad), *Goat-antimouse* (BioRad) y *Goat-antirabbit* (Santa Cruz Biotechnology

Inc.). Las diluciones de anticuerpos primarios y secundarios fueron 1:1.000 y 1:10.000, respectivamente. El análisis de la imagen se realizó utilizando el software Image Lab 6.0 de BioRad (Berkeley, California).

3.14. Evaluación histológica del hígado

Para la evaluación histológica del hígado del modelo animal KO LDLr, las secciones de hígado (5 µm) embebidas en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para evaluar los cambios patológicos en los hígados.

El análisis del área fibrótica en los hígados del modelo KO LDLr se determinó como depósito de fibras de colágeno con tinción Sirius Red, evaluándose mediante el conteo directo de píxeles en imágenes binarias (aumento 10x). El área promedio se calculó a partir de 10 imágenes por hígado. Por su parte, la evaluación de las células estrelladas hepáticas positivas para GATA4 sirvió como un segundo análisis del área fibrótica en estos hígados del modelo KO LDLr. Para ello, las secciones de hígado se desparafinaron e hidrataron. Tras un paso previo para inactivar la peroxidasa endógena, los cortes se bloquearon e incubaron con un anticuerpo específico dirigido contra GATA4 (dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante una noche. La incubación con GATA4 se realizó con el sustrato de peroxidasa diaminobenzidina (DAB) para desarrollar el color, utilizando el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). Esta inmunotinción se observó bajo microscopía de luz de campo brillante (Leica, Wetzlar, Alemania).

Para el análisis de marcadores de inflamación para el modelo KO LDLr, y del mismo modo que para GATA4, las secciones hepáticas se desparafinaron e hidrataron y tras el bloqueo, los cortes hepáticos se incubaron con el anticuerpo específico dirigido contra MOMA-2 (dilución 1:100, Abcam). La incubación de MOMA-2 se realizó con un anticuerpo secundario *Goat Anti-mouse*

IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (dilución 1:300, Abcam) y los cortes se observaron bajo microscopía de fluorescencia (Leica, Wetzlar, Alemania). Para visualizar los núcleos, se realizó una contratinción con DAPI (dilución 1:500, Sigma Aldrich). El análisis se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.)

Por su parte, y para el análisis del área fibrótica en los hígados del modelo animal KO NLRP3 (grupos controles WT y grupos *NLRP3*^{-/-}), las secciones cortadas (5 µm) de hígado incluidas en parafina se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson. Las áreas fibróticas se calcularon mediante el conteo directo (aumento 40x), obteniendo el área promedio a partir de 10 imágenes por hígado.

3.15. Análisis de actividad SOD

En análisis de la actividad superóxido dismutasa en tejidos hepáticos del modelo KO NLRP3 se realizó mediante un kit comercial de ensayo de actividad SOD (Canvax), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizaron homogenados tisulares de secciones de hígado del modelo de ratón KO NLRP3 (grupos controles WT y grupos *NLRP3*^{-/-}). En este ensayo, la detección de actividad SOD se mide como el porcentaje de inhibición de la tasa de formación del compuesto WST-1 formazán (absorbancia a 450 nm). En la reacción de conversión de Xantina y O₂ a ácido úrico y H₂O₂ por la xantina oxidasa, se generan iones superóxidos. El anión superóxido convierte el producto de tetrazolio WST-1 en un producto coloreado WST-1 formazán. La adición de SOD a esta reacción reduce los niveles de iones superóxido, disminuyendo así la velocidad de formación del compuesto WST-1 formazán. De este modo, y como se ha explicado anteriormente, la actividad de SOD es un reflejo de la inhibición de formación de este complejo.

3.16. Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas entre pares se realizaron utilizando la prueba t de Student no pareada cuando las variables son paramétricas. Cuando están normalmente distribuidas se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que cuando las variaciones son homogéneas, se utilizó la prueba F de Levene. Para las variables no paramétricas, los grupos se compararon mediante una prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones entre grupos con variables paramétricas se probaron utilizando ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey. En el caso de variables no paramétricas, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EE. UU.). Los valores se expresaron como medias \pm SEM, donde los valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EXTRACTOS NATURALES DE CHAMPIÑONES (*AGARICUS BISPORUS*)

SIN EFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS Y ANIMALES.

La toxicidad de los extractos *AbAEE* fue testada tanto en células (líneas celulares Huh7.5 y LX2), como en animales, en un modelo animal de rata.

El ensayo de viabilidad con azul de tripán realizado en la línea celular Huh7.5 mostró resultados de baja toxicidad para las concentraciones de *AbAEE* de 1 mg/mL (14,40 % toxicidad) y 0,2 mg/mL (5,55 % de toxicidad) (**Tabla 8**). Del mismo modo, las concentraciones de *AbAEE* con menor porcentaje de toxicidad en la línea celular LX2 fueron 1 mg/mL (9,37% de toxicidad) y 0,2 mg/mL (4,71% de toxicidad) (**Tabla 9**). El criterio para la selección de una concentración idónea de *AbAEE* fue la de no superar el 10% de toxicidad. De este modo, las células Huh7.5 se trataron con *AbAEE* a una concentración de 0,2 mg/mL a tiempos de 72 horas. En cuanto a las células LX2, fueron tratadas con concentraciones de 1 y 0,2 mg/mL de *AbAEE* a tiempos de 24 horas.

Tabla 8. Viabilidad y toxicidad en células Huh7.5 usando diferentes concentraciones de *AbAEE*

<i>AbAEE</i> (mg/mL)	Contaje total celular	Contaje células viables	Contaje células muertas	Viabilidad (%)	Toxicidad (%)
10	13,6 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	12,3 x 10 ⁶	9,55	90,44
5	16,3 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	13,2 x 10 ⁶	19,01	80,98
2	18,8 x 10 ⁶	9,1 x 10 ⁶	9,7 x 10 ⁶	48,40	51,59
1	23,6 x 10 ⁶	20,2 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	85,59	14,40
0,2	25,2 x 10 ⁶	23,8 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	94,44	5,55

Tabla 9. Viabilidad y toxicidad en células LX2 usando diferentes concentraciones de *AbAEE*

<i>AbAEE</i> (mg/mL)	Contaje total celular	Contaje células viables	Contaje células muertas	Viabilidad (%)	Toxicidad (%)
10	14,8 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	13,0 x 10 ⁶	12,16	87,83
5	18,2 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	14,6 x 10 ⁶	19,78	80,21
2	23,8 x 10 ⁶	13,6 x 10 ⁶	10,2 x 10 ⁶	57,14	42,85
1	25,6 x 10 ⁶	23,2 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	90,62	9,37
0,2	27,6 x 10 ⁶	26,3 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	95,28	4,71

En cuanto a la toxicidad de los extractos *AbAEE* en animales, y tal como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos, tres grupos de ratas fueron alimentadas con dosis de *AbAEE* a diferente concentración, tras lo cual se examinaron los efectos fisiológicos y cambios de comportamientos en estos animales. Debido a que ninguno de los tres grupos mostró signos de toxicidad, sólo se muestran los resultados del grupo TA-III, tratado con la dosis más alta de 5000 mg/kg de peso corporal de *AbAEE* disuelto en 3 mL de agua (**Tabla 10**). Se analizaron diferentes parámetros físicos observables y de comportamiento, a las 4, 8 y 24 horas y a los 14 días tras la administración del extracto. Los resultados mostraron una ausencia de signos de morbilidad y mortalidad en los animales tratados. Debido a ello, no se pudo estimar la dosis letal 50 (DL50), pero se espera que supere los 5000 mg/kg *AbAEE*. Estos resultados proporcionan una evidencia que respalda la seguridad de la administración oral de los extractos *AbAEE*, teniendo una relevancia directa para la protección de la salud humana respecto a su uso como alimento funcional o nutracéutico.

Tabla 10. Toxicidad aguda (estudio preliminar de toxicidad) en ratas (dosis 5000 mg/kg AbAEE)

Parámetros observables	Tras el tratamiento con AbAEE			
	4h	8h	24h	14 días
Piel	Normal	Normal	Normal	Normal
Ojos	Normal	Normal	Normal	Normal
Membrana mucosa	Normal	Normal	Normal	Normal
Patrones de comportamiento				
Salivación	Normal	Normal	Normal	Normal
Letargo	Normal	Normal	Normal	Normal
Diarrea	No observado	No observado	No observado	No observado
Temblores	No observado	No observado	No observado	No observado
Coma	No observado	No observado	No observado	No observado
Muerte	No observado	No observado	No observado	No observado

4.2.EXTRACTOS NATURALES DE CHAMPIÑONES (*AGARICUS BISPORUS*) COMO INHIBIDORES DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

La inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC por extractos *AbAEE* fue detectada como resultado de un examen rutinario de inhibidores y activadores de enzimas con un interés médico-farmacéutico. A partir de este primer resultado, se hicieron ensayos *in vitro* con diferentes fracciones de *AbAEE* obtenidas por ultrafiltración y por ELL, tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos.

4.2.1. Fracciones de bajo peso molecular *AbAEE* inhiben a la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C

Con el fin de obtener información sobre el tamaño del compuesto/s responsables de la actividad, el extracto *AbAEE* se fraccionó mediante ultrafiltración, tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, obteniendo las siguientes tres fracciones: UF-100 (≤ 100 kDa), UF-20 (≤ 20 kDa), y UF-3 (≤ 3 kDa). Estas tres fracciones junto con Telaprevir (como control positivo) se analizaron para determinar la inhibición de la proteasa NS3, y los resultados se muestran en la **Figura 13**. Los niveles de actividad de la proteasa (utilizando la proteína NS3 recombinante genotipo 1b) se expresan como porcentajes referidos a un control negativo (100 %) en ausencia de inhibidores (E+S). Los niveles de actividad de proteasa fueron los siguientes: UF-3 con un $23,7 \pm 2,7$ % ($p \leq 0,001$), UF-20 con un $33,2 \pm 9,9$ % ($p \leq 0,05$), UF-100 con un $52,9 \pm 2,1$ % ($p \leq 0,001$) y el extracto bruto *AbAEE* con un $50,41 \pm 2,0$ % ($p \leq 0,001$), frente al control TPV. Estos resultados muestran que el grado de inhibición fue, para las fracciones UF-3, UF-20, *AbAEE* bruto y UF-100, de $76,3 \pm 2,7$ %, $66,8 \pm 9,9$ %, $49,59 \pm 2,0$ % y $47,1 \pm 2,1$ % respectivamente. La fracción de menor tamaño (≤ 3 kDa), UF-3, presentó los mayores niveles de inhibición, en torno al 77 %. Estos

resultados indican la presencia de un inhibidor o inhibidores de la proteasa NS3/4A en todas las fracciones ensayadas, y que este o estos compuestos tienen un peso molecular bajo (≤ 3 kDa).

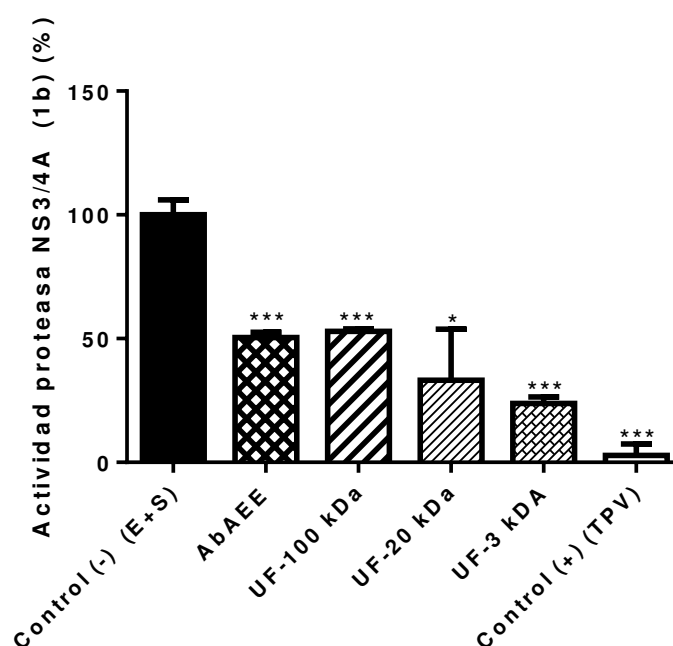


Figura 13. Inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC (genotipo 1b) en presencia de diferentes extractos de AbAEE obtenidos ultrafiltración. Control (-): control negativo de inhibición (E+S, 100 % actividad); Control (+): control positivo de inhibición (TPV 0,5 mM). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ /** $p \leq 0,001$ vs. Control.

4.2.2. Fracciones solubles AbAEE inhiben a la proteasa NS3/4A del virus de la Hepatitis C

Con el fin de obtener información sobre la naturaleza química del compuesto o compuestos responsables de la inhibición de la proteasa NS3/4A *in vitro*, UF-3, la fracción con la mayor actividad de inhibición se fraccionó mediante ELL secuencial utilizando tres disolventes con polaridad diferente (hexano, diclorometano y acetato de etilo). El UF-3 es un extracto complejo, que contiene compuestos polares, debido a su carácter acuoso, aunque también cuenta con

compuestos apolares. Este hecho justifica la selección de extractantes con diferente índice de polaridad, con el fin de mejorar el fraccionamiento y la cobertura de los compuestos identificados. De este modo, la fracción UF-3 fue fraccionada por segunda vez mediante ELL secuencial, tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, obteniendo cuatro fracciones: fracción de hexano (HF-3 kDa), fracción de diclorometano (DMF-3 kDa), fracción de acetato de etilo (AEF-3 kDa) y fracción acuosa (AcF-3 kDa). Las cuatro fracciones obtenidas por ELL secuencial (HF-3 kDa, DMF-3 kDa, AEF-3 kDa y AcF-3 kDa), utilizando TPV 0,5 mM como control positivo, fueron analizadas para probar la actividad inhibidora de la proteasa NS3/4A VHC (genotipo 1b) *in vitro*. Los niveles de actividad de la proteasa (utilizando la proteína NS3 recombinante del genotipo 1b) se expresan como porcentajes referidos a un control negativo (100 %) en ausencia de inhibidores (E+S). El porcentaje de actividad NS3/4A del VHC fue de $12,3 \pm 6,0$ % ($p \leq 0,001$) en presencia de AcF-3 kDa, $21,1 \pm 2,7$ % ($p \leq 0,001$) en presencia de AEF-3 kDa, $16,4 \pm 9$ % ($p \leq 0,001$) en presencia de DMF-3 kDa, y finalmente, $32,8 \pm 13$ % ($p \leq 0,01$) en presencia de HF-3 kDa, en comparación con el control negativo. Estos datos mostraron que los grados de inhibición fueron: 87,7 % (AcF-3 kDa), 83,6 % (DMF-3 kDa), 78,9 % (AEF-3 kDa) y 67,2 % (HF-3 kDa) (**Figura 14**). Los extractos orgánicos se reconstituyeron en DMSO y el extracto acuoso de UF en agua destilada. Los altos niveles de actividad de proteasa en presencia de DMSO y agua destilada sugieren que ninguno de ellos interfiere con la actividad inhibitoria (datos no mostrados).

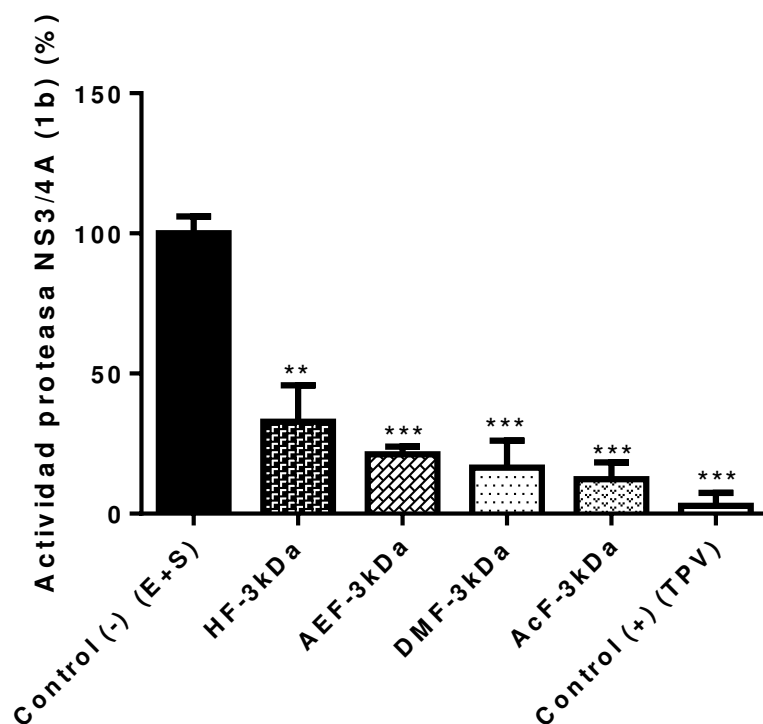


Figura 14. Inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC (genotipo 1b) en presencia de diferentes extractos de AbAEE obtenidos por ELL secuencial. Control (-): control negativo de inhibición (E+S, 100 % actividad); Control (+): control positivo de inhibición (TPV 0,5 mM). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ /*** $p \leq 0,001$ vs. Control.

4.2.3. El extracto AbAEE presenta capacidad de inhibición de diferentes genotipos de proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C

Los resultados obtenidos hasta el momento en un ensayo *in vitro* de actividad proteasa NS3/4A del VHC (genotipo 1b), ha determinado que son fracciones de bajo peso molecular (inferior a 3 kDa) y carácter polar las que producen inhibición. Con el fin de comprobar la capacidad inhibitoria de estas fracciones de AbAEE en otros genotipos virales, se comprobó dicho efecto utilizando proteasas NS3/4A recombinante de los genotipos 2a y 3a del VHC. Los niveles de actividad de la proteasa (utilizando la proteína NS3 recombinante del genotipo 2a y 3a) se expresan como porcentajes referidos a un control negativo (100 %) en ausencia de inhibidores (E+S). El

porcentaje de actividad NS3/4A del VHC (genotipo 2a) fue de $22,5 \pm 3,0\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AbAEE bruto y $19,47 \pm 3,53\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AcF-3 kDa. Esto indica unos porcentajes de inhibición el $77,5 \pm 3,0\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AbAEE y del $80,53 \pm 3,53\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AcF-3 kDa (**Figura 15**). Usando el genotipo 3a NS3/4A del VHC, el porcentaje de actividad de proteasa fue $31,79 \pm 2,27\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AbAEE bruto, y $27,09 \pm 4,0\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AcF-3 kDa. Los niveles de inhibición para este genotipo son, por tanto, del $68,21 \pm 2,27\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AbAEE y del $72,91 \pm 4,0\%$ ($p \leq 0,001$) en presencia de AcF-3 kDa (**Figura 16**).

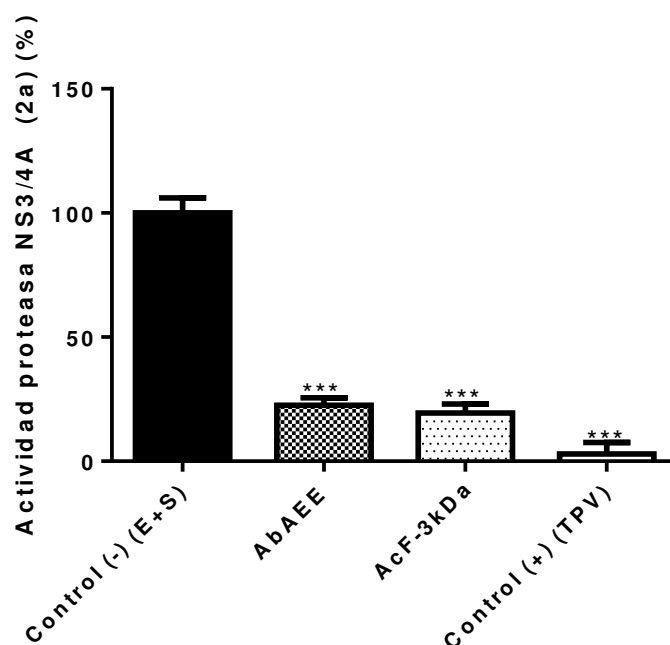


Figura 15. Inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC (genotipo 2a) en presencia de diferentes extractos de AbAEE obtenidos por ultrafiltración y ELL secuencial (AbAEE y AcF-3 kDa). Control (-): control negativo de inhibición (E+S, 100 % actividad); Control (+): control positivo de inhibición (TPV 0,5 mM). A). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ /*** $p \leq 0,001$ vs. Control.

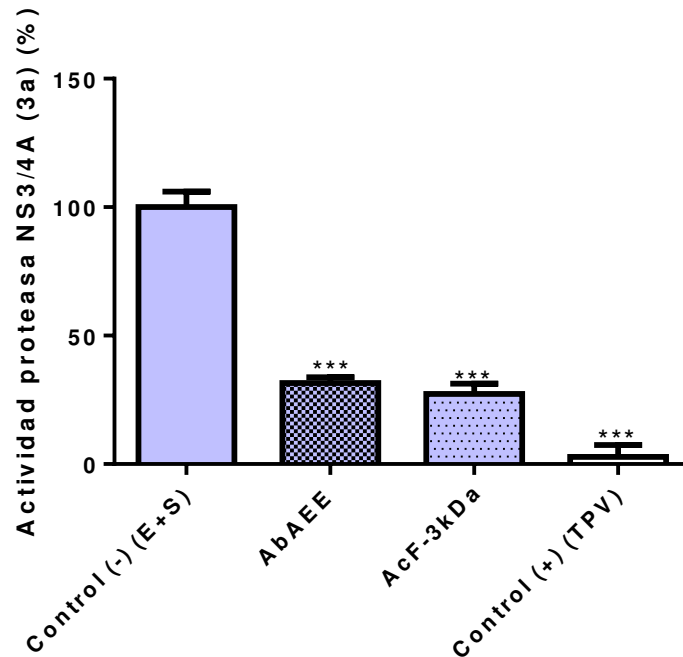


Figura 16. Inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC (genotipo 3a) en presencia de diferentes extractos de AbAEE obtenidos por ultrafiltración y ELL secuencial (AbAEE y AcF-3 kDa). Control (-): control negativo de inhibición (E+S, 100 % actividad): Control (+): control positivo de inhibición (TPV 0,5 mM). A). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ vs. Control.

4.2.4. El extracto AbAEE impide la replicación viral del virus de la hepatitis

C

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que aquellas fracciones AbAEE de carácter polar y peso molecular inferior a 3 kDa fueron las que presentaron mayores niveles de inhibición de actividad proteasa NS3/4A *in vitro*, en torno a un 88 %. Estos resultados se demuestran para los genotipos 1b, 2a y 3a del VHC. Para evaluar el efecto de estos extractos sobre la replicación del genoma del VHC, se realizó un ensayo con células Huh7.5 infectadas ARN JFH-1 del VHC (genotipo 2a). Las células fueron tratadas, tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos, con extracto de AbAEE (0,2 mg/mL) y quercetina (50 μ M), durante un período de 72

horas. Como era de esperar, no se observó ningún efecto tóxico. Los resultados mostraron una reducción significativa con grado de inhibición $93,3\pm0,21\%$ ($p\leq0,01$) de los niveles intracelulares de ARN del VHC con el tratamiento de AbAEE (**Figura 17**). La quercetina también produjo una reducción significativa de estos niveles, con un grado de inhibición del $66,2\pm1\%$ ($p\leq0,01$), pero no tanto como los extractos de *Agaricus bisporus*. En cuanto a los niveles de ARN extracelular de VHC, para lo cual se recogieron los sobrenadantes de cultivo, los tratamientos con quercetina y AbAEE redujeron la carga viral de una manera significativa, alcanzando un grado de inhibición del $39,7\pm0,55\%$ ($p\leq0,01$) y del $33,6\pm3,1\%$ ($p\leq0,01$), respectivamente, como consecuencia de la inhibición de la replicación del genoma del VHC (**Figura 18**).

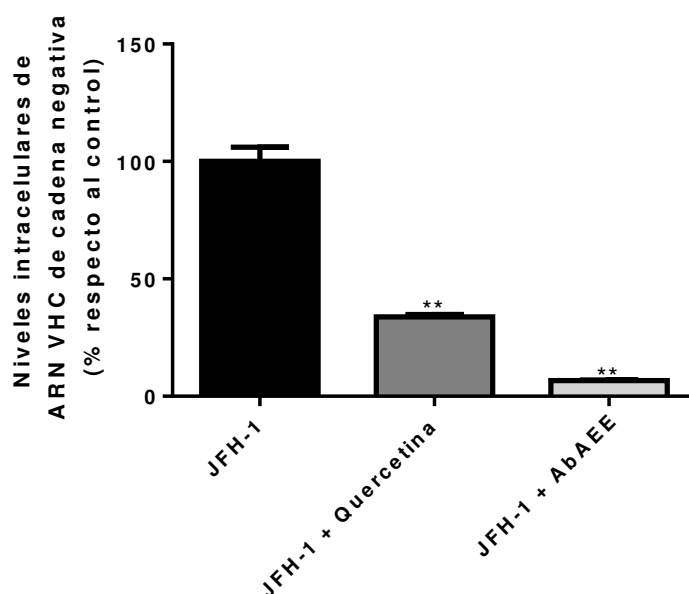


Figura 17. Niveles de ARN intracelular de cadena negativa del VHC en células Huh7.5 infectadas con JFH1 (MOI de 1) tratadas con 50 μ M de quercetina (JFH1+ Quercetina) y 0,2 mg/mL de AbAEE (JFH1+ AbAEE). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$). * $p\leq0,05$ /** $p\leq0,01$ /*** $p\leq0,001$ vs. Control.

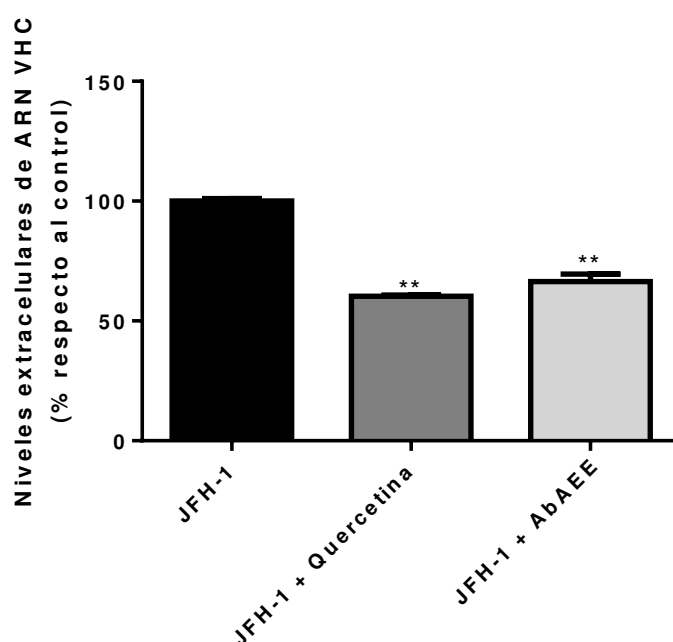


Figura 18. Niveles de ARN extracelular (%) del VHC en células Huh7.5 infectadas con JFH1 (MOI de 1) tratadas con 50 μ M de quercetina (JFH1+ Quercetina) y 0,2 mg/mL de AbAEE (JFH1+ AbAEE). Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ /*** $p \leq 0,001$ vs. Control.

Estos resultados se confirmaron con el análisis de producción extracelular de las partículas virales en células Huh7.5 tras los tratamientos indicados. Los niveles proteicos del núcleo (core) y de la proteasa NS3/4A se redujeron significativamente con el tratamiento de quercetina ($0,49 \pm 0,13$, $p \leq 0,05$; $0,72 \pm 0,04$, $p \leq 0,01$), respectivamente (**Figura 19A**). El extracto AbAEE produjo mejores resultados de inhibición, siendo los niveles proteicos del núcleo y de la proteasa NS3/4A de $0,08 \pm 0,04$ ($p \leq 0,01$) y $0,02 \pm 0,02$ ($p \leq 0,001$), respectivamente (**Figura 19B**). Estos resultados fueron normalizados frente a los niveles de β -actina.

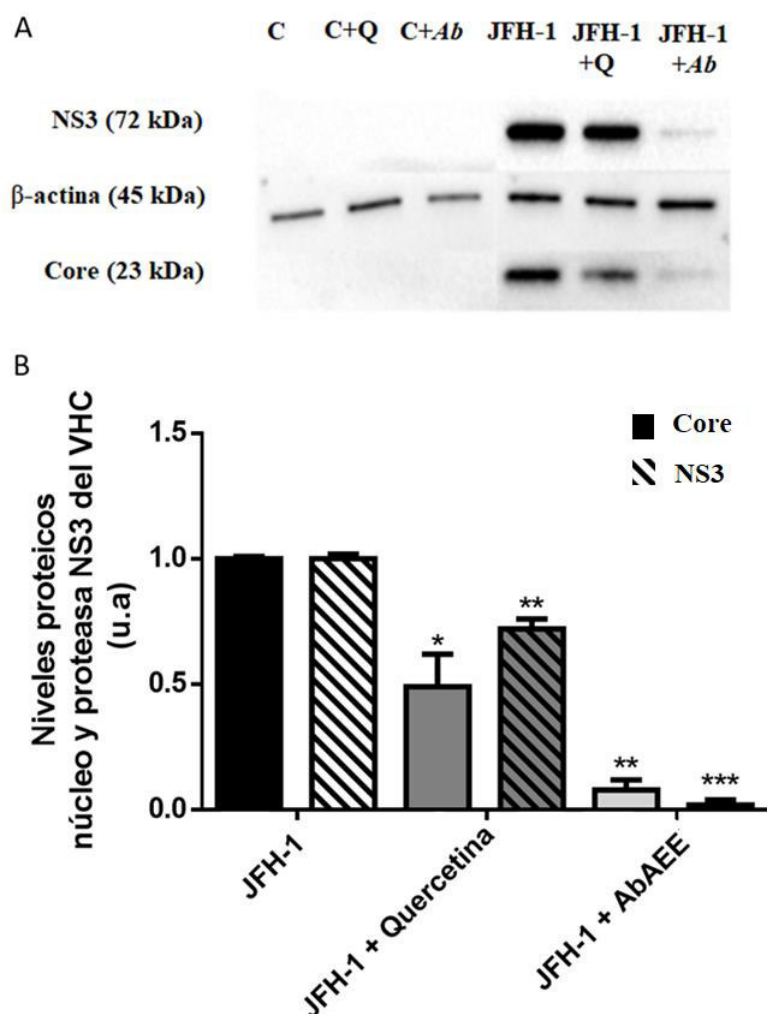


Figure 19. A) Western blot representativo de los niveles proteicos de la proteasa NS3 del VHC, el núcleo o core del VHC y la β -actina en células Huh7.5 transfectadas con ARN JFH-1 (VHC genotipo 2a) y tratadas con quercetina (Q) 50 μ M y AbAEE (Ab) 0,2 mg/mL. B) Niveles proteicos de la proteasa NS3 y el núcleo o core del VHC normalizados frente a los niveles de β -actina. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ /*** $p \leq 0,001$ vs. Control.

4.2.5. Caracterización química del extracto AbAEE

Con el objetivo de realizar una primera caracterización del extracto AbAEE para el estudio de los elementos que lo componen y su posible implicación en la inhibición de la proteasa NS3/4A, se realizó un análisis químico, tal y como se ha detallado en el apartado de materiales y métodos, por LC/MS-QTOF, en colaboración con la Prof. Dra. María Dolores Luque de Castro, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba (Campus Universitario de

Rabanales). Dado que los resultados ya obtenidos muestran que la mayor inhibición de actividad NS3 es promovida por la fracción UF-3kDa (87,7 % de inhibición) y AqF-3kDa (76,3 % de inhibición), la caracterización se realizó para dichas fracciones, además de compararlas con el resto de las fracciones orgánicas (HF-3kDa, DMF-3kDa y EAF-3kDa) obtenidas por ELL secuencial, que se muestran agrupadas por presentar resultados similares de composición. El análisis de UF-3, sin fraccionamiento por ELL secuencial, mostró 87 compuestos presentes, mientras que el análisis de AcF-3kDa detectó 91 compuestos, que pueden atribuirse al fraccionamiento orgánico por ELL (**Tabla 11**). La composición del extracto es compleja, y por ello se puede apreciar como la mayoría de los compuestos están presentes en las dos fracciones indicadas. Si se analiza la información obtenida de este análisis químico, existen cinco compuestos que aparecen en todas las fracciones, incluidas las orgánicas (ergotioneina, adenina, guanina, hipoxantina y xantina), destacadas en color azul en la tabla 11. Estos cinco compuestos podrían ser los posibles candidatos que participaran de manera activa en la inhibición de la proteasa, por el hecho de estar presente en fracciones para las cuales se ha encontrado actividad inhibitoria frente a la NS3/4A del VHC. Además, existen cuatro compuestos, marcados en color verde en la tabla 11 (ácido succínico, glucosamina, p-aminofenol y ornitina), que aparecen en la fracción AcF-3kDa y en la UF-3kDa, pero no en las fracciones orgánicas, pudiendo completar, como elementos más específicos o con mayor potencial de inhibición, el conjunto de compuestos inhibidores frente a la proteasa NS3, ya que es la fracción AcF-3kDa la que mayores porcentajes de inhibición presenta en comparación con el resto de las fracciones.

Tabla 11. Lista de metabolitos identificados por LC/MS-QTOF en las diferentes fracciones de AbAEE (UF-3kDa, AcF-3kDa y fracciones orgánicas obtenidas por ELL secuencial HF-3kDa, DCM-3kDa y EAF-3kDa agrupadas).

Metabolito	UF-3kDa	AcF-3kDa	OrgF-ELL
Derivados de alcaloides			
2- metilpirrolidina	+	+	-
Alquilaminas			
Ácido pantoténico	+	+	-
Espermidina	+	+	-
Pirrolinas			
Pirrolina-1	+	+	-
Aminoácidos y derivados			
Acetilcarnitina	+	+	-
Citrulina	+	+	-
Ergotioneina	+	+	+
L-agaritina	+	+	-
L-arginina	+	+	-
L-asparagina	+	+	-
Ácido L-aspartico	+	+	-
L-carnitina	+	+	-
L-glutamato	+	+	-
L-glutamina	+	+	-
L-isoleucina	+	+	-
L-Leucina	+	+	-
L-Lisina	+	+	-
L-metionina	+	+	-
L-fenialanina	+	+	-
L-prolina	+	+	-
L-serina	+	+	-
L-treonina	+	+	-
L-triptófano	+	+	-
L-tirosina	+	+	-
L-valina	+	+	-
Ornitina	+	+	-
Péptidos			
Glutación oxidado	+	+	-
Indoles			
Formil-indol	-	-	+
Indol-3-acetato	-	-	+
Ácidos carboxílicos y derivados			
Ácido cítrico	+	+	-
Ácido láctico	+	+	-
Ácido málico	+	+	-
Ácido succínico	+	+	-
Ácido cinámico y derivados			
Ácido p-cumárico	+	+	-
Disacáridos			

Ácido celobiónico	+	+	-
α -1,5-L-Arabinobiosa	+	+	-
Monosacáridos			
D-Glucosamina 6-fosfato	+	+	-
D-Glucosa 6-fosfato	+	+	-
D-Manitol	+	+	-
D-Manitol 1-fosfato	+	+	-
Azúcares y derivados			
Ácido galactónicos	+	+	-
Ácido glucurónico	+	+	-
Ácido glicérico	+	+	-
Glicerol-2-fosfato	+	+	-
Xilonato	+	+	-
Ácidos grasos y conjugados			
Epsilcapramina	+	+	-
Ácido esteárico	-	-	+
Amidas grasas			
Oleamida	-	-	+
Esfingolípidos			
Esfingonina	-	-	+
Fosfolípidos y derivados			
Fosfocolina	+	+	-
Glicerofosfocolina	+	+	-
Compuestos oxoaniónicos no metálicos			
Fosfatos	+	+	-
Fosfitos	+	+	-
Derivados de fenol			
P-aminofenol	+	+	+
Derivados del nucleósido de purina			
Xantosina	+	+	-
Nucleótidos de purina y derivados			
AMP	+	+	-
ADP	+	+	-
GDP-manosa	+	+	-
GMP	+	+	-
Purina y derivados de purina			
Adenina	+	+	+
Guanina	+	+	+
Hipoxantina	+	+	+
Ácido úrico	+	+	-
Xantina	+	+	+
Nucleótidos de pirimidina y derivados			
UMP	+	+	-
UDP-D-xilosa	+	+	-
UDP-glucosa	+	+	-
Ácido- UDP-glucurónico	+	+	-

4.3.EXTRACTOS NATURALES DE CHAMPIÑONES (*AGARICUS BISPORUS*) COMO MODULADORES DE LA FIBROSIS, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN HEPÁTICA IN VITRO Y EN UN MODELO ANIMAL DE EHGNA.

Los resultados anteriores han demostrado que los extractos de *A. bisporus* tienen capacidad de inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC, cubriendo diferentes genotipos de éste. A continuación, se demuestra como los extractos *AbAEE* son, a su vez, moduladores de la fibrosis, estrés oxidativo e inflamación hepática derivada de la enfermedad hepática por dieta alta en grasa, la EHGNA.

4.3.1. El tratamiento de células LX2 con extractos de *AbAEE* reducen los niveles de marcadores fibróticos y estrés oxidativo e incrementan los niveles del factor protector GATA4.

Con el fin de comprobar los efectos que los extractos *AbAEE* tienen frente a los daños por fibrosis hepática, células LX2 fueron tratadas, tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, con *AbAEE* a dos concentraciones diferentes: 0,2 mg/mL y 1 mg/mL, durante un período de 24 horas. Las células no tratadas fueron tomadas como control. Los extractos *AbAEE* redujeron significativamente los niveles génicos de *COL-1 α -1*, con resultados de $0,14\pm0,06$ ($p\leq0,001$) y $0,69\pm0,11$ (Control $1\pm0,10$) a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL, respectivamente (**Figura 20A**). Los niveles proteicos de este marcador fibrótico también se vieron reducidos en células LX2 tratadas con *AbAEE*, disminuyendo a $0,47\pm0,04$ ($p\leq0,01$) y $0,77\pm0,11$ (Control $1\pm0,12$), a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL, respectivamente (**Figura 20B**). En este mismo estudio, los niveles génicos de *TPM2 β* , otro marcador de fibrosis, se redujeron hasta $0,02\pm0,16$ ($p\leq0,01$) y $0,59\pm0,24$ (Control $1\pm0,12$), a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL de *AbAEE*, respectivamente (**Figura 21A**).

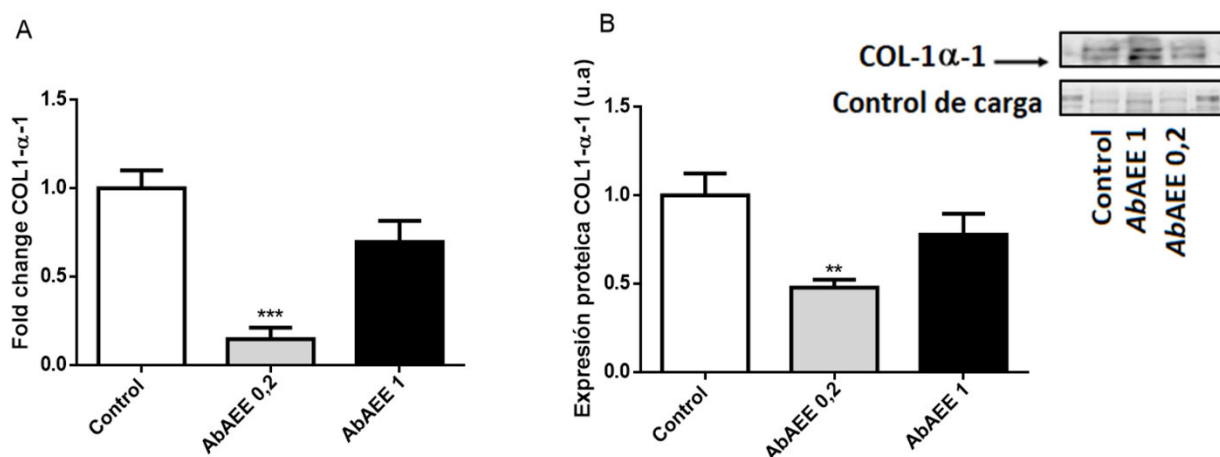


Figura 20. Niveles de expresión génica y proteica del marcador fibrótico COL-1α-1 en células LX2 tratadas con AbAEE a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL durante un período de 24 horas. A) Expresión génica *Col-1α-1* B) Expresión proteica COL-1α-1. Todos los datos se expresan como la media± SEM ($n=5$). * $p\leq 0,05$ /** $p\leq 0,01$ / *** $p\leq 0,001$ vs. Control.

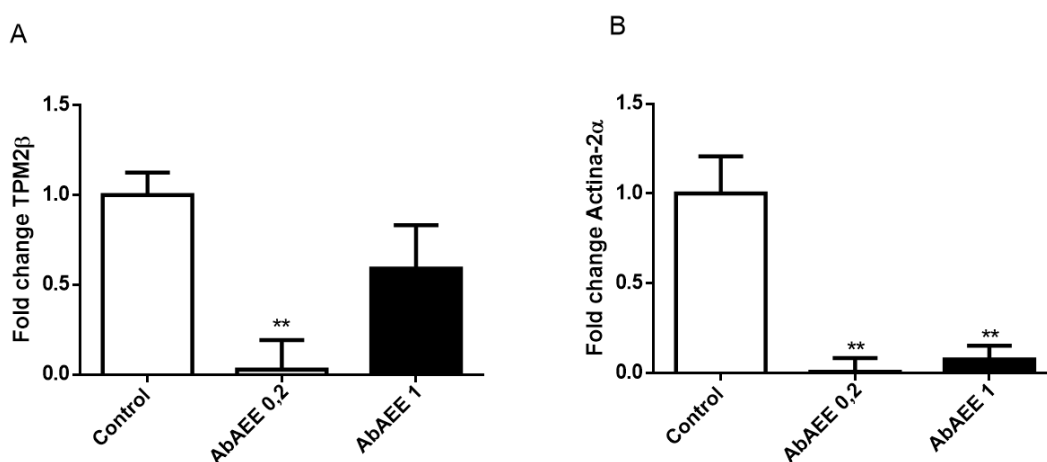


Figura 21. Niveles de expresión génica de los marcadores fibróticos *Tpm2β* y *Acta-2α* en células LX2 tratadas con AbAEE a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL durante un período de 24 horas. A) Expresión génica *Tpm2β* B) Expresión génica *Acta-2α*. Todos los datos se expresan como la media± SEM ($n=5$). * $p\leq 0,05$ /** $p\leq 0,01$ / *** $p\leq 0,001$ vs. Control.

Los niveles génicos reducidos de expresión génica de *Acta-2α* apoyó los resultados anteriores, disminuyendo sus niveles $0,007 \pm 0,08$ ($p \leq 0,01$) y $0,07 \pm 0,07$ ($p \leq 0,01$) (Control $1 \pm 0,20$) a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL de AbAEE, respectivamente (**Figura 21B**). Por su lado, el factor protector y marcador fibrótico positivo GATA4 incrementó tanto sus niveles génicos ($2,62 \pm 0,14$; $p \leq 0,001$ y $1,46 \pm 0,14$; $p \leq 0,05$ (Control $1 \pm 0,11$)) a concentraciones 0,2 y 1 mg/mL de AbAEE, como sus niveles proteicos ($1,45 \pm 0,13$; $p \leq 0,05$ y $1,72 \pm 0,09$; $p \leq 0,05$ (Control $1 \pm 0,09$)) a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL de AbAEE, respectivamente (**Figura 22**).

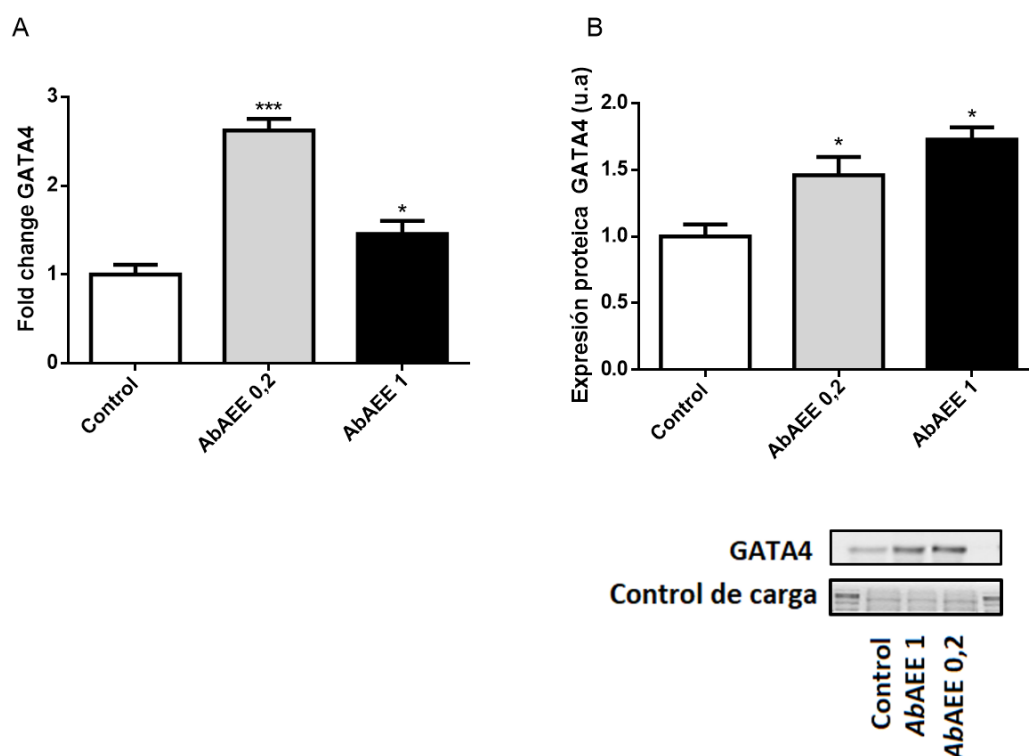


Figura 22. Niveles de expresión génica y proteica del marcador fibrótico GATA4 en células LX2 tratadas con AbAEE a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL durante un período de 24 horas. A) Expresión génica *Gata4* B) Expresión proteica GATA4. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ vs. Control.

Hasta ahora, se ha demostrado cómo los extractos de *A.bisporus* actúan frente a la fibrosis hepática debido a niveles génicos y proteicos reducidos de marcadores fibróticos tras el tratamiento de células estrelladas hepáticas LX2. La fibrosis hepática, como ya se desarrolló en el apartado introductorio de este trabajo, se acompaña de otros daños en el hígado, como es el estrés oxidativo. El análisis de los efectos producidos por los extractos en relación con este proceso podría aportar más información sobre la función de éstos. Debido a ello, se midieron marcadores de estrés oxidativo en las células LX2 tratadas con AbAEE a las dos mismas concentraciones que en los experimentos anteriores. Los resultados mostraron una niveles génicos reducidos de expresión génica de *Sod2* a $0,08 \pm 0,11$ ($p \leq 0,001$) y $0,29 \pm 0,12$ ($p \leq 0,001$) (Control $1 \pm 0,07$), a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL, respectivamente (**Figura 23**). Asimismo, los niveles génicos del marcador *Nos2* se redujeron hasta $0,01 \pm 0,11$ ($p \leq 0,01$) y $0,25 \pm 0,18$ ($p \leq 0,05$) (Control $1 \pm 0,17$) en presencia de AbAEE a 0,2 y 1 mg/mL, respectivamente (**Figura 24**).

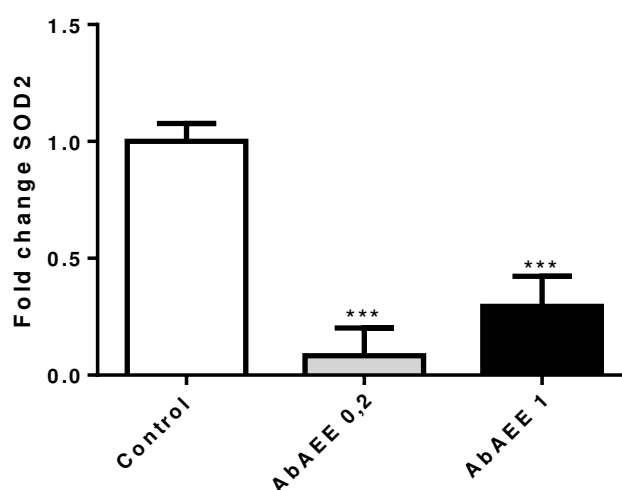


Figura 23. Niveles de expresión génica del marcador de estrés oxidativo *Sod2* en células LX2 tratadas con AbAEE a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL durante un período de 24 horas. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5$). * $p \leq 0,05$ /** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ vs. Control.

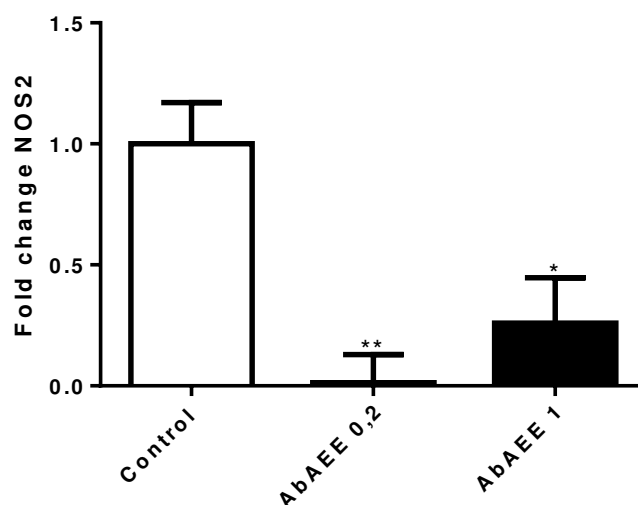


Figura 24. Niveles de expresión génica del marcador de estrés oxidativo *Nos2* en células LX2 tratadas con AbAEE a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL durante un período de 24 horas. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n= 5$). * $p\leq 0,05$ /** $p\leq 0,01$ / *** $p\leq 0,001$ vs. Control.

4.3.2. Los extractos AbAEE regulan el peso corporal de los ratones EHGNA alimentados con dieta alta en grasa.

Los resultados en células LX2 describen a los extractos AbAEE como reguladores del proceso de fibrosis y de estrés oxidativo que le acompaña. La fibrosis hepática suele estar enmarcada en diversas enfermedades hepáticas y metabólicas, siendo una de las de mayor interés la EHGNA. Para comprobar si el efecto producido en células por los extractos de *A.bisporus* sigue la misma línea en un modelo *in vivo*, ratones KO del receptor LDL fueron alimentados con dieta alta en grasa, tal y como se ha descrito en su correspondiente apartado en materiales y métodos, para así simular la EHGNA, y tratados a la vez con los extractos AbAEE (período de 12 semanas).

Los primeros resultados obtenidos corresponden a la cinética del peso corporal del ratón durante el período de tiempo de 12 semanas. Los grupos alimentados con dieta alta en grasa, tanto los grupos control (HFD45) como los alimentados con el extracto *AbAEE* (HFD60+AB), mostraron un peso corporal significativamente mayor en comparación con los grupos alimentados con dieta baja en grasa o grupos LFD ($p \leq 0,01$ entre grupos de control, $p \leq 0,05$ entre grupos tratados) (**Figura 25A**). Sin embargo, al hacer la comparación entre aquellos ratones alimentados con dieta alta en grasa, el análisis de los resultados es diferente. Los ratones HFD60+AB presentan un mayor contenido en grasa (60%) que su control HFD45 (45% contenido en grasa) y, a pesar de esta diferencia, presentan valores de peso corporal final similares (**Figura 25A**). Esto es un indicativo de que los extractos *AbAEE* regulan el peso corporal, ya que el alto contenido en grasa de los grupos tratados no generó una subida de peso en comparación con su control, con menor contenido en grasa. En cuanto a la ganancia de peso, el área bajo la curva para el peso corporal aumentó significativamente en los grupos HFD en comparación con los grupos LFD ($p \leq 0,001$ en grupos control; $p \leq 0,01$ en grupos tratados con *AbAEE*) (**Figura 25B**). Los niveles de glucosa en sangre aumentaron significativamente en ambos grupos HFD, control HFD45 y HFD60+AB, tras un período de 12 semanas, en comparación con los dos grupos LFD, tanto el control como LFD+AB ($p \leq 0,05$ entre los grupos de control, $p \leq 0,01$ entre los grupos tratados) (**Figura 25C**). Del mismo modo que con el parámetro de peso corporal, no se observaron diferencias en los niveles de glucosa entre grupos HFD45 y HFD60+AB, a pesar del mayor contenido de grasa y calorías de la dieta en este último grupo (**Figura 25C**). Finalmente, los niveles de GOT/AST aumentaron significativamente en el grupo control HFD45 en comparación con los niveles del grupo control LFD ($p \leq 0,001$) tras 12 semanas (**Figura 25D**). En los grupos tratados con *AbAEE* la tendencia fue similar, aunque menos pronunciada, y sin encontrar diferencias significativas (**Figura 25D**). Es importante tener en cuenta que la dieta HFD60+AB mostró los mismos niveles de GOT/AST que el grupo HFD45, a pesar del mayor contenido en grasa y calorías.

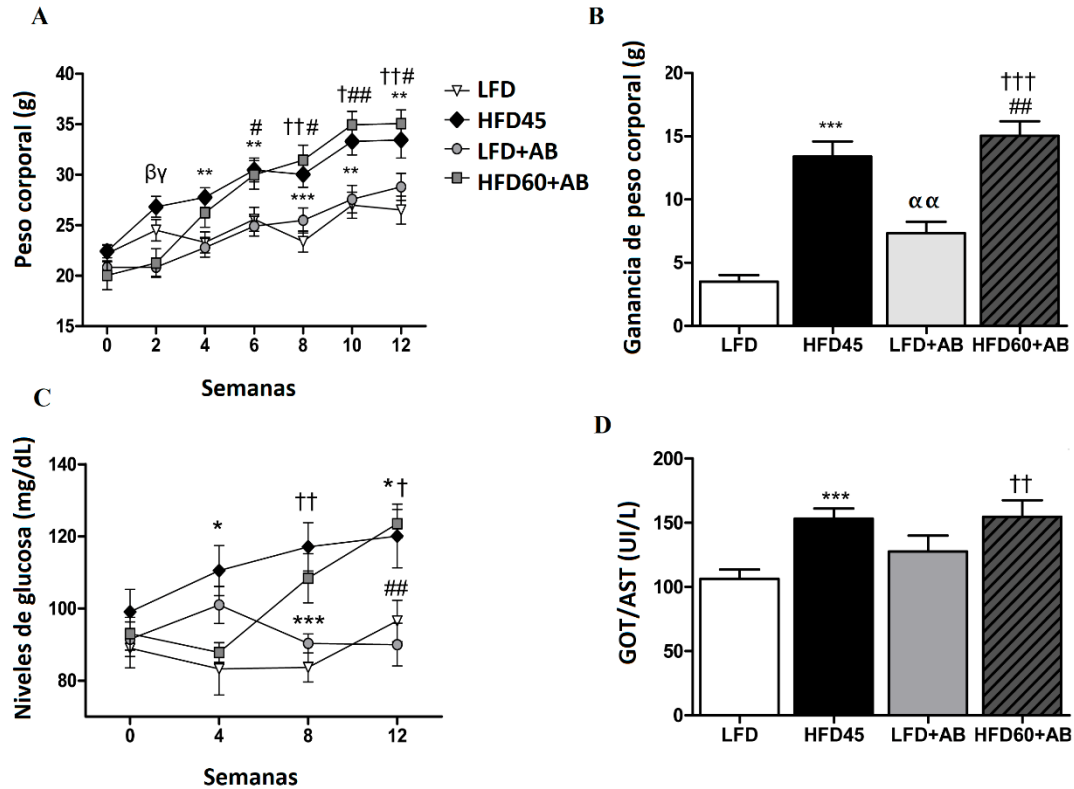


Figura 25. Peso corporal y parámetros bioquímicos en sangre de ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLR*^{-/-}) durante 12 semanas de intervención nutricional con *AbAEE*. A) Cambios en el peso corporal durante un período de 12 semanas B) Área bajo la curva de los pesos corporales C) Glucemia durante un período de 12 semanas D) Niveles finales de GOT/AST. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ LFD vs HFD45; # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ LFD+AB vs HFD60+AB; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha \alpha p \leq 0,01$ / $\alpha \alpha \alpha p \leq 0,001$ LFD vs LFD+AB; $\beta p \leq 0,05$ / $\beta \beta p \leq 0,01$ / $\beta \beta \beta p \leq 0,001$ HFD45 vs HFD60+AB; $\dagger p \leq 0,05$ / $\dagger \dagger p \leq 0,01$ / $\dagger \dagger \dagger p \leq 0,001$ LFD vs HFD60+AB; $\gamma p \leq 0,05$ / $\gamma \gamma p \leq 0,01$ / $\gamma \gamma \gamma p \leq 0,001$ HFD45 vs LFD+AB.

4.3.3. Los extractos *AbAEE* reducen los niveles génicos de marcadores fibróticos y de estrés oxidativo en ratones EHGNA.

Los resultados obtenidos en relación con los procesos de fibrosis hepática y estrés oxidativo *in vitro* hacen necesario el estudio de los mismos marcadores en un modelo *in vivo* (modelo animal de ratón KO *LDLR*), con el fin de confirmar los efectos antifibróticos y antioxidantes de los extractos *AbAEE*. Tal y como se sospechaba, los resultados obtenidos *in vivo* fueron un claro

reflejo de los obtenidos *in vitro*. El tratamiento con AbAEE redujo significativamente los niveles génicos de *Col-1 α -1* ($0,45\pm0,06$ en el grupo LFD+AB (Control LFD $1\pm0,40$) y $0,56\pm0,03$ ($p\leq0,05$) en el grupo HFD60+AB (Control HFD45 $1,65\pm0,38$) (**Figura 26A**), incrementando los niveles del factor protector *Gata4* en el grupo LFD+AB hasta alcanzar valores de $1,38\pm0,13$ ($p\leq0,05$) (Control LFD $0,5\pm0,22$) y de $1,44\pm0,03$ ($p\leq0,01$) en el grupo HFD60+AB (Control HFD45 $0,18\pm0,02$) (**Figura 26B**).

Los niveles génicos de estrés oxidativo también se vieron reducidos con el tratamiento con AbAEE: los ratones LFD+AB presentaron niveles de *Sod2* de hasta $0,05\pm0,002$ ($p\leq0,05$) (Control LFD $0,9\pm0,06$) y $0,7\pm0,02$ ($p\leq0,01$) en el grupo HFD+AB (Control HFD $5,7\pm0,23$) (**Figura 27A**), y del marcador inflamatorio *Nos2* de $0,65\pm0,08$ en el grupo LFD+AB (Control LFD $0,66\pm0,18$) y $0,73\pm0,03$ ($p\leq0,05$) en el grupo HFD+AB (Control HFD $2,5\pm0,38$) (**Figura 27B**).

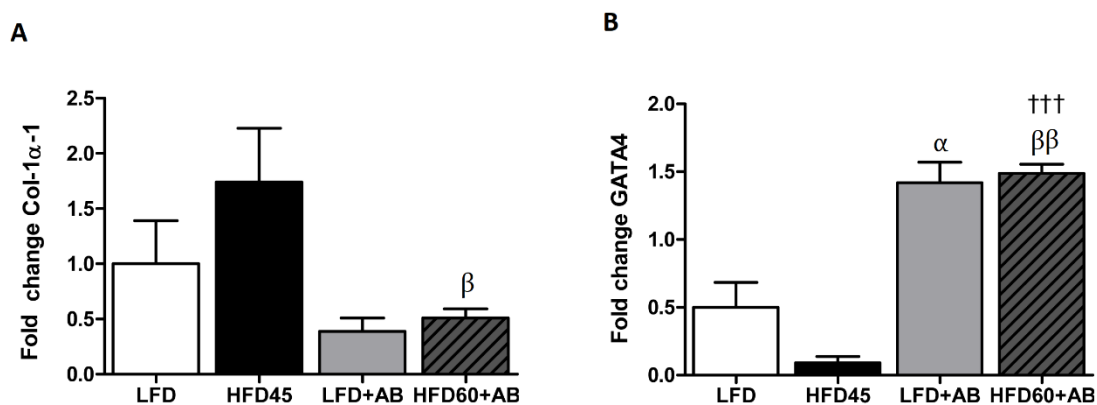


Figura 26. Análisis de expresión génica de marcadores de fibrosis y estrés oxidativo en hígados de ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) tras 12 semanas de intervención nutricional con AbAEE. A) *Col-1 α -1* B) *Gata4*. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n= 5$ por grupo). * $p\leq 0,05$ / ** $p\leq 0,01$ / *** $p\leq 0,001$ LFD vs HFD45; # $p\leq0,05$ / ## $p\leq0,01$ / ### $p\leq 0,001$ LFD+AB vs HFD60+AB; $\alpha p\leq0,05$ / $\alpha\alpha p\leq0,01$ / $\alpha\alpha\alpha p\leq0,001$ LFD vs LFD+AB; $\beta p\leq0,05$ / $\beta\beta p\leq0,01$ / $\beta\beta\beta p\leq0,001$ HFD45 vs HFD60+AB; $\dagger p\leq0,05$ / $\dagger\dagger p\leq0,01$ / $\dagger\dagger\dagger p\leq0,001$ LFD vs HFD60+AB; $\gamma p\leq 0,05$ / $\gamma\gamma p\leq 0,01$ / $\gamma\gamma\gamma p\leq 0,001$ HFD45 vs LFD+AB.

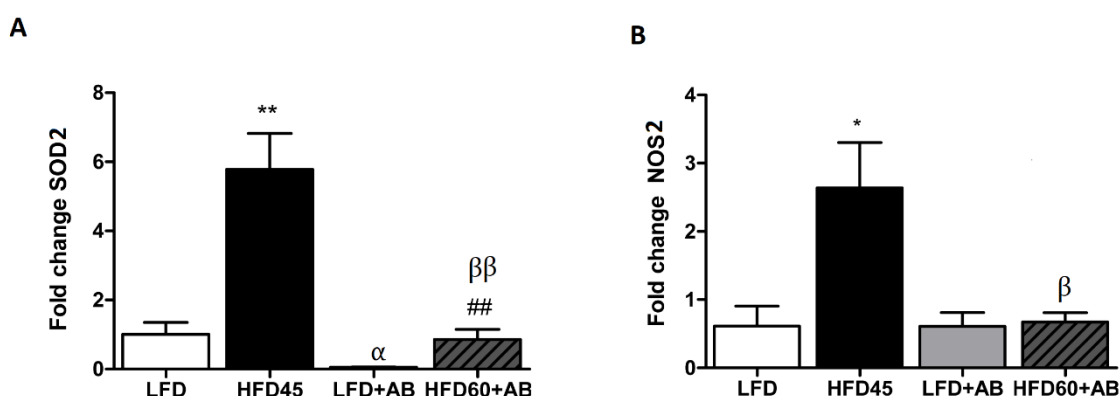


Figura 27. Análisis de expresión génica de marcadores de fibrosis y estrés oxidativo en hígados de ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) tras 12 semanas de intervención nutricional con *AbAEE*. A) *Sod2* B) *Nos2*. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ LFD vs HFD45; # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ LFD+AB vs HFD60+AB; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha\alpha p \leq 0,01$ / $\alpha\alpha\alpha p \leq 0,001$ LFD vs LFD+AB; $\beta p \leq 0,05$ / $\beta\beta p \leq 0,01$ / $\beta\beta\beta p \leq 0,001$ HFD45 vs HFD60+AB; $\dagger p \leq 0,05$ / $\dagger\dagger p \leq 0,01$ / $\dagger\dagger\dagger p \leq 0,001$ LFD vs HFD60+AB; $\gamma p \leq 0,05$ / $\gamma\gamma p \leq 0,01$ / $\gamma\gamma\gamma p \leq 0,001$ HFD45 vs LFD+AB.

4.3.4. Los extractos *AbAEE* reducen la fibrosis e inflamación hepática en ratones EHGNA alimentados con dieta alta en grasa.

Se hicieron diferentes análisis para comprobar el efecto que los extractos *AbAEE* tenían sobre la esteatosis y los niveles proteicos de marcadores fibrogénicos y de inflamación en el modelo de ratón KO LDLr. La tinción con H&E dio una idea del grado de esteatosis en los distintos grupos de ratones. La esteatosis aumentó en aquellos grupos tratados con *AbAEE* en comparación con los grupos control no tratados, con independencia de las dietas (**Figura 28A, arriba**). A pesar de ello, los resultados con tinción Sirius Red mostraron, de manera significativa, una menor acumulación de fibras de colágeno, y, por tanto, menor grado de fibrosis, en los grupos tratados con *AbAEE* en comparación con los no tratados (LFD vs LFD+AB ($p \leq 0,05$); HFD45 vs HFD60+AB ($p \leq 0,05$)). Además, la acumulación de fibras de colágeno fue mayor, de manera significativa, en el grupo control HFD45 en comparación con el control LFD ($p \leq 0,01$), mientras que esto no ocurrió entre

los grupos HFD60+AB y LFD45+AB, a pesar del mayor porcentaje en grasa y calorías que la dieta del grupo de ratones HFD60+AB presentaban (**Figura 28A, medio y Figura 28B**).

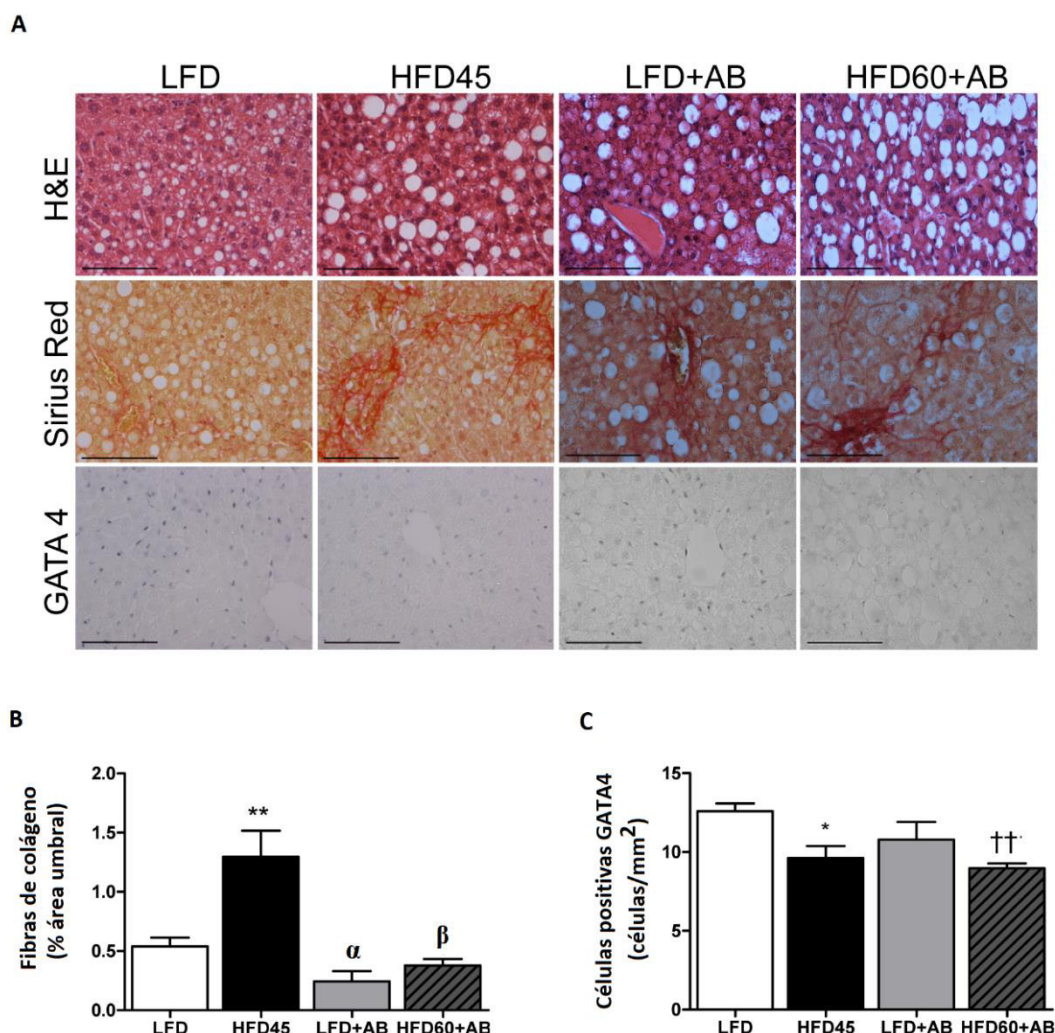


Figura 28. Análisis histológico del daño en el hígado inducido por una dieta HFD en ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr^{-/-}*) tras un período de 12 semanas de intervención nutricional con extracto *AbAEE*. A) Secciones representativas del hígado. Arriba: Tinción H&E, Medio: Tinción Sirius Red, Abajo: Inmunohistoquímica GATA4 (40x, escala = 100 μ m) B) % área de fibras hepáticas de colágeno teñidas con Sirius Red. C) Cuantificación de células positivas para GATA4. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ LFD vs HFD45; # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ LFD+AB vs HFD60+AB; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha\alpha p \leq 0,001$ LFD vs LFD+AB; $\beta p \leq 0,05$ / $\beta\beta p \leq 0,01$ / $\beta\beta\beta p \leq 0,001$ HFD45 vs HFD60+AB; $\dagger p \leq 0,05$ / $\dagger\dagger p \leq 0,01$ / $\dagger\dagger\dagger p \leq 0,001$ LFD vs HFD60+AB; $\gamma p \leq 0,05$ / $\gamma\gamma p \leq 0,01$ / $\gamma\gamma\gamma p \leq 0,001$ HFD45 vs LFD+AB.

El número de células hepáticas estrelladas positivas para GATA4 (**Figura 28A, abajo**) fue similar entre los grupos de alimentación de LFD, tanto los tratados con *AbAEE* como los controles. Los resultados obtenidos de los grupos de alimentación HFD determinaron niveles similares, sin diferencias significativas, entre los grupos HFD45 y HFD60+AB, a pesar de estar este último grupo alimentado con una dieta más alta en grasa y calorías (**Figura 28A, abajo y Figura 28C**).

Finalmente, y debido a la relación existente entre fibrosis, estrés oxidativo e inflamación, se midieron la cantidad de células positivas para MOMA-2 (marcador inflamatorio) en los diferentes grupos de ratones KO LDLr. Los resultados mostraron una reducción significativa de células MOMA-2 en el grupo HFD60+AB ($p \leq 0,01$), en comparación con su control **HFD45 (Figura 29A y Figura 29B)**, a pesar del mayor contenido de grasas y calorías en esta dieta. También se observó una reducción significativa en las células MOMA-2 en el grupo LFD+AB ($p \leq 0,05$) en comparación con su control LFD (**Figura 29**).

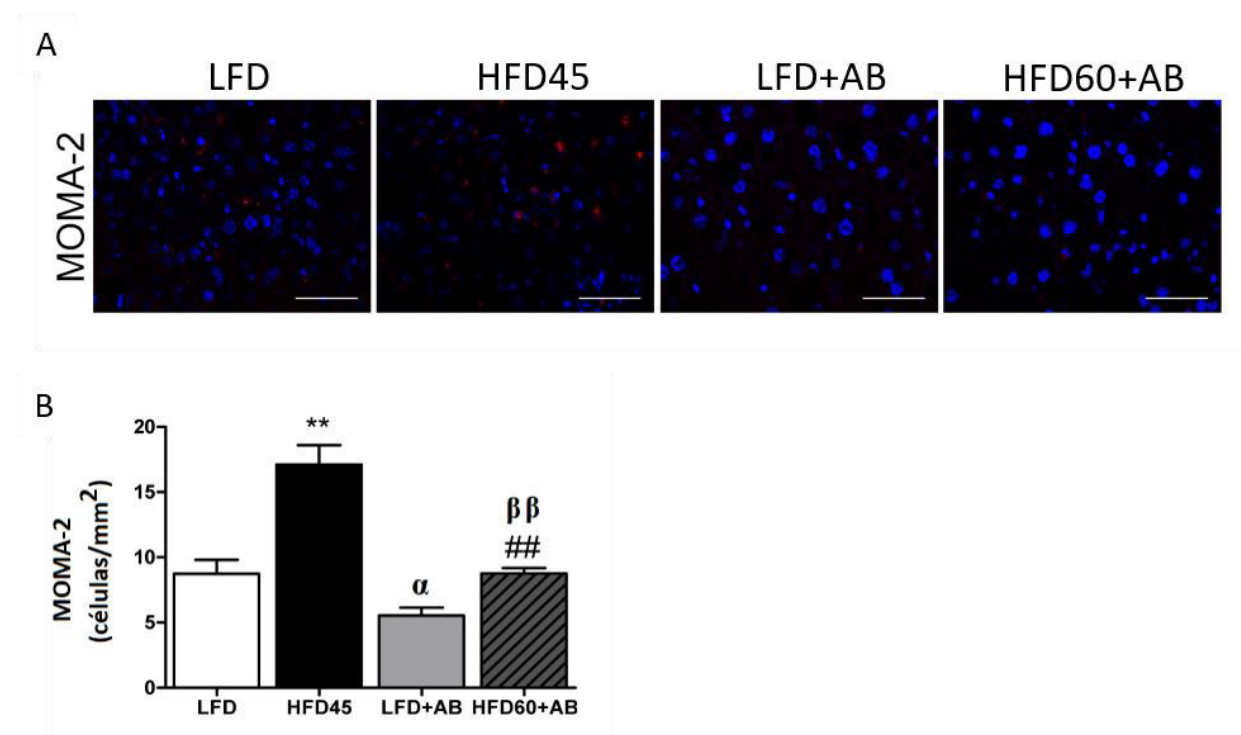


Figura 29. Análisis de la inflamación inducida por una dieta HFD en ratones *knock-out* (KO) del receptor de LDL (*LDLr*^{-/-}) tras un período de 12 semanas de intervención nutricional con extracto *AbAEE*. A) Inmunohistoquímica con un anticuerpo específico dirigido contra MOMA-2 (rojo). Núcleo fue contrateñido con DAPI (azul) (40x, escala= 50

μm). B) Cuantificación de células positivas para MOMA-2. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=5$ por grupo). $*p \leq 0,05$ / $**p \leq 0,01$ / $***p \leq 0,001$ LFD vs HFD45; $\#p \leq 0,05$ / $\##p \leq 0,01$ / $\###p \leq 0,001$ LFD+AB vs HFD60+AB; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha\alpha p \leq 0,01$ / $\alpha\alpha\alpha p \leq 0,001$ LFD vs LFD+AB; $\beta p \leq 0,05$ / $\beta\beta p \leq 0,01$ / $\beta\beta\beta p \leq 0,001$ HFD45 vs HFD60+AB; $\dagger p \leq 0,05$ / $\dagger\dagger p \leq 0,01$ / $\dagger\dagger\dagger p \leq 0,001$ LFD vs HFD60+AB; $\gamma p \leq 0,05$ / $\gamma\gamma p \leq 0,01$ / $\gamma\gamma\gamma p \leq 0,001$ HFD45 vs LFD+AB.

4.4. EL COMPLEJO NLRP3 INFLAMASOMA COMO DIANA CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LA ENFERMEDAD EHGNA: FIBROSIS, METABOLISMO LIPÍDICO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Los resultados obtenidos hasta el momento, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, otorgan propiedades antifibróticas, antioxidantes y antiinflamatorias a los extractos de *Agaricus bisporus*. El proceso de fibrosis hepática puede desencadenarse por daños hepáticos provocados, inicialmente, por diferentes factores, siendo uno de ellos la acumulación anormal de lípidos, derivada de una esteatosis o, concretando en algo más específico, una EHGNA. Esta acumulación anormal de lípidos genera un incremento de especies reactivas de oxígeno que activan las vías inflamatorias, provocando finalmente la activación de células estrelladas hepáticas que se vuelven fibrogénicas, y que derivan a un proceso fibrótico más grave. Estos procesos, como ya se ha descrito en apartados anteriores, son regulados por los extractos AbAEE, por lo que el estudio de cada uno de ellos en un modelo animal KO NLRP3 podría aportar información sobre cómo la vía inflamatoria influye en dichos procesos, y, por tanto, cómo se regulan a través de esta.

Con el fin de profundizar en el mecanismo por el que los extractos reducen marcadores de daño hepático y su relación con las vías inflamatorias, se realizó un estudio con ratones KO del complejo inflamasoma NLRP3 para medir diferentes marcadores de fibrosis, metabolismo lipídico y estrés oxidativo.

4.4.1. La ausencia del complejo NLRP3 inflamasoma no afecta al peso corporal de los ratones, pero reduce los niveles de colesterol en sangre

Los primeros resultados obtenidos corresponden a los valores de peso corporal de los ratones durante el período de tiempo de 20 meses. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la ganancia de peso final entre los ratones control WT y aquellos que carecen del complejo NLRP3, tan sólo una leve reducción en ratones jóvenes (3 meses) y adultos (12 meses) del grupo *NLRP3*^{-/-}, valores que incrementaba en ratones viejos (20 meses) respecto a su control WT, aunque

prácticamente se mantenía en valores similares de peso (**Figura 30A**). Lo que sí se observó fue una tendencia ascendente en la ganancia de peso a lo largo del tiempo desde 3 hasta los 20 meses (**Figura 30A**). La ganancia de peso se relaciona con la ingesta, la cual tampoco muestra diferencias significativas entre grupos controles WT y grupos *NLRP3*^{-/-} (**Figura 30B**). La ingesta es ligeramente mayor en ratones jóvenes (3 meses) y adultos (12 meses) *NLRP3*^{-/-} en comparación con sus controles WT, mientras que, en aquellos de 20 meses, la ingesta se ve ligeramente incrementada en los ratones WT. La tendencia en la ingesta de alimentos es descendente a lo largo del tiempo. Esto quiere decir que la ingesta de alimentos y la ganancia de peso a lo largo de 20 meses es inversamente proporcional, efecto que se ve más claro en aquellos ratones ausentes del complejo NLRP3 (**Figura 30B**). Por su lado, los niveles de colesterol en sangre se redujeron significativamente en los ratones *NLRP3*^{-/-} JO ($p \leq 0,05$) y aún más en los grupos de ratones *NLRP3*^{-/-} VJ ($p \leq 0,001$) en comparación con sus controles WT (**Figura 30C**). Los niveles de glucosa no mostraron diferencia entre los grupos controles WT JO y los grupos ausentes del complejo NLRP3 en ratones jóvenes, aunque sí se apreció una reducción significativa ($p \leq 0,001$) de los niveles de glucosa en aquellos ratones viejos *NLRP3*^{-/-} VJ en comparación con sus controles WT VJ (**Figura 30D**).

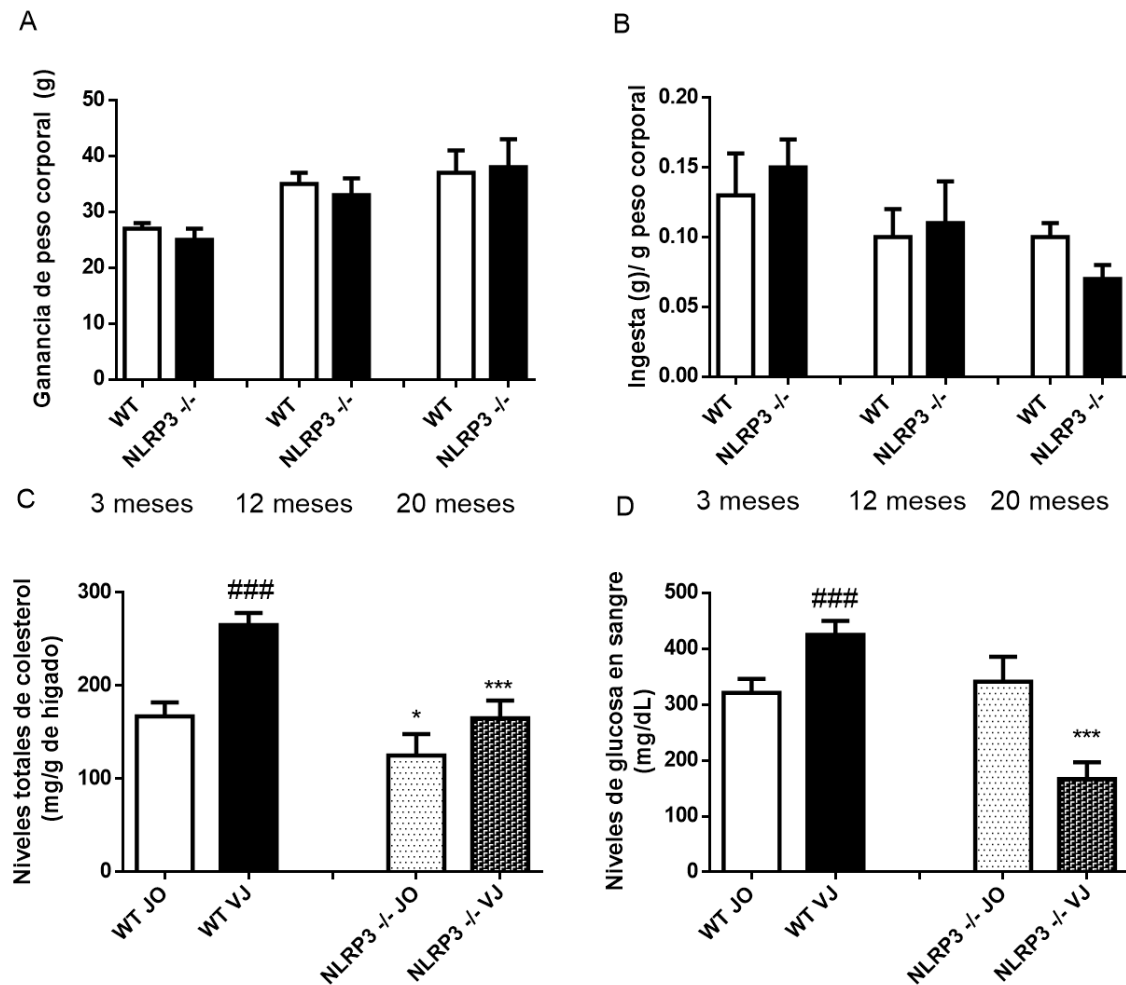


Figura 30. Peso corporal, ingesta y parámetros bioquímicos en sangre de ratón *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3*^{-/-}) durante 20 meses. A) Ganancia peso corporal (g) B) Ingesta de alimentos (g) por gramo de peso corporal C) Niveles finales de colesterol (mg/g de hígado) D) Niveles finales glucosa en sangre (mg/dL). Todos los datos se expresan como la media± SEM (*n*= 2 por grupo). **p*≤ 0,05/ ***p*≤ 0,01/ ****p*≤ 0,001 NLRP3^{-/-} (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); #*p*≤0,05/ ##*p*≤0,01/ ###*p*≤ 0,001 WT JO vs WT VJ; α*p*≤0,05/ αα*p*≤0,01/ ααα*p*≤0,001 NLRP3^{-/-} JO vs NLRP3^{-/-} VJ.

4.4.2. La ausencia del complejo NLRP3 inflammasoma mejora los niveles de marcadores de metabolismo lipídico en ratones KO NLRP3

La ausencia del complejo NLRP3 inflammasoma alteró los niveles de marcadores metabólicos en comparación con los controles WT. Se observaron niveles proteicos reducidos de MTP, un marcador de metabolismo lipídico, en aquellos ratones *NLRP3*^{-/-} en comparación a sus controles

WT (**Figura 31**). Concretamente, esta reducción fue más acusada en aquellos grupos de ratones viejos, *NLRP3*^{-/-} VJ, donde los niveles proteicos de MTP fueron de $0,80 \pm 0,29$ en comparación con los ratones WT VJ (Control WT VJ $1,31 \pm 0,12$). En ratones jóvenes se observaron niveles proteicos reducidos de MTP, aunque muy leve y en la que apenas se muestra diferencia entre los grupos *NLRP3*^{-/-} JO y WT JO, ya que los valores del primer grupo fueron de $1,18 \pm 0,05$ (Control WT JO $1,42 \pm 0,04$) (**Figura 31**).

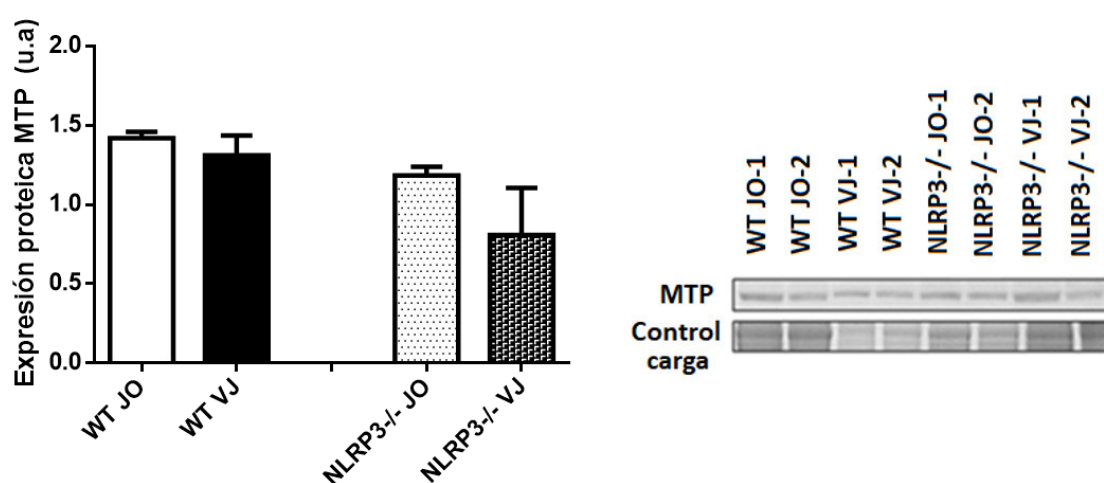


Figura 31. Niveles de expresión proteica del marcador de metabolismo lipídico MTP en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3*^{-/-}) y controles WT, tras un período de 20 meses semanas. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 2$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ *NLRP3*^{-/-} (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha \alpha p \leq 0,01$ / $\alpha \alpha \alpha p \leq 0,001$ *NLRP3*^{-/-} JO vs *NLRP3*^{-/-} VJ.

Esta tendencia se repite en otros marcadores metabólicos, observándose un descenso de los niveles de expresión proteica FASN en ambos grupos de ratones, jóvenes y viejos (**Figura 32**). Se observó una disminución de los niveles proteicos de FASN en aquellos grupos de ratones *NLRP3*^{-/-} JO ($0,89 \pm 0,12$) en comparación con sus controles WT (Control $1,12 \pm 0,04$) (**Figura 32**). Este descenso de la expresión proteica de FASN pudo observarse también en los grupos de ratones más

viejos, resultando en una disminución significativa de sus niveles proteicos de hasta $0,63 \pm 0,14$ ($p \leq 0,05$) en el grupo $NLRP3^{-/-}$ VJ (Control WT VJ $1,82 \pm 0,03$) (**Figura 32**).

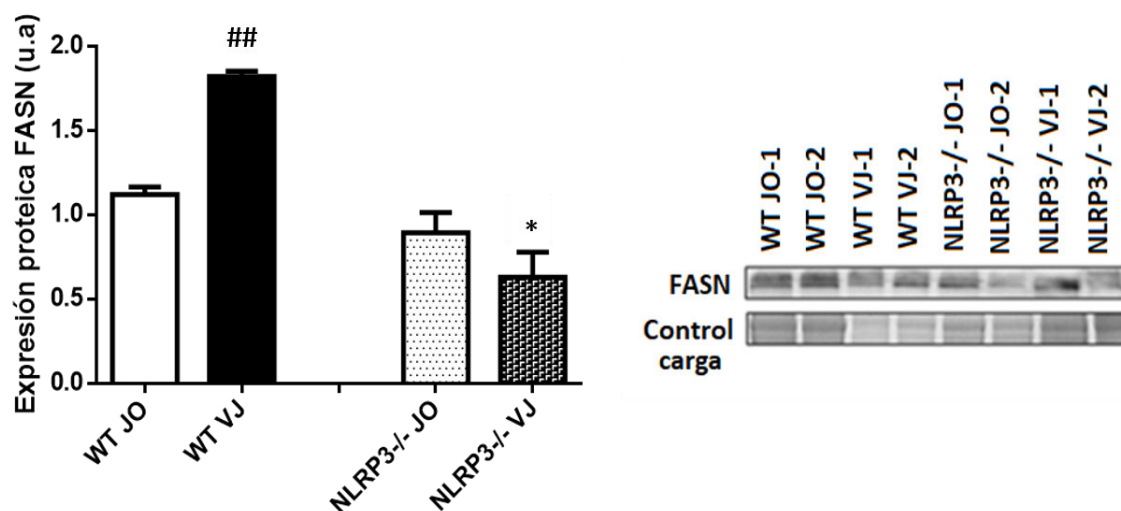


Figura 32. Niveles de expresión proteica del marcador de metabolismo lipídico FASN en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma ($NLRP3^{-/-}$) y controles WT, tras un período de 20 meses semanas. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 2$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ $NLRP3^{-/-}$ (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha \alpha p \leq 0,01$ / $\alpha \alpha \alpha p \leq 0,001$ $NLRP3^{-/-}$ JO vs $NLRP3^{-/-}$ VJ.

Finalmente, y analizando un último marcador de metabolismo lipídico, DGAT1, sólo se pudo observar niveles proteicos reducidos de este marcador en los ratones jóvenes $NLRP3^{-/-}$ JO, con valores de $0,77 \pm 0,20$ (Control $1,08 \pm 0,12$) (**Figura 33**). En el grupo de ratones $NLRP3^{-/-}$ VJ, los niveles proteicos de FASN fueron muy similares a los de su control WT VJ (**Figura 33**).

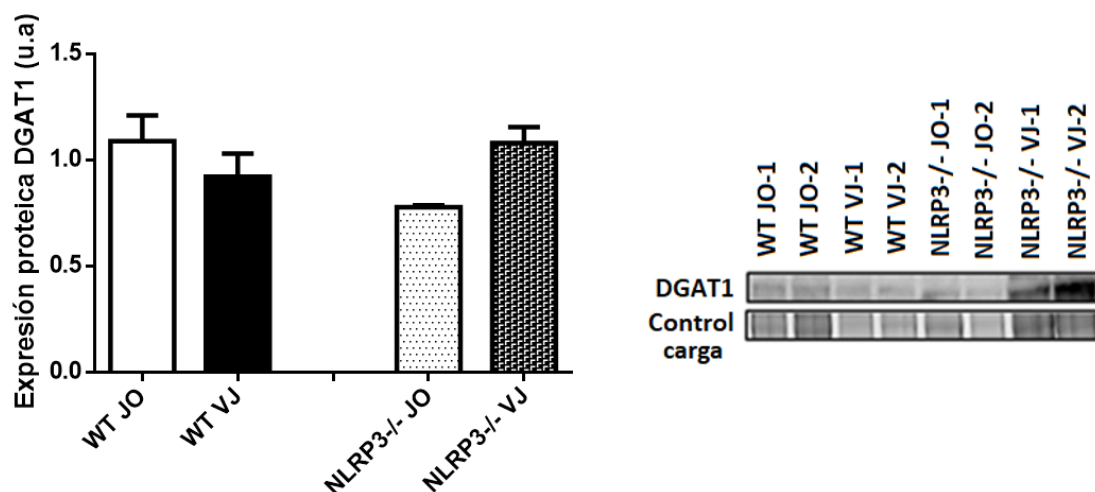


Figura 33. Niveles de expresión proteica del marcador de metabolismo lipídico DGAT1 en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y controles WT, tras un período de 20 meses semanas. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=2$ por grupo). * $p\leq 0,05$ / ** $p\leq 0,01$ / *** $p\leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* (JO/VJ) *vs* WT (JO/VJ); # $p\leq 0,05$ / ## $p\leq 0,01$ / ### $p\leq 0,001$ WT JO *vs* WT VJ; $\alpha p\leq 0,05$ / $\alpha\alpha p\leq 0,01$ / $\alpha\alpha\alpha p\leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* JO *vs* *NLRP3^{-/-}* VJ.

4.4.3. La ausencia del complejo NLRP3 inflammasoma mejora los niveles de marcadores de estrés oxidativo en ratones KO NLRP3

Hasta ahora, la ausencia del complejo NLRP3 ha demostrado regular los niveles de marcadores de metabolismo lipídico, lo cual indica la relación entre los procesos inflamatorios y de acumulación lipídica. El estudio de marcadores de estrés oxidativo en este tipo de ratones KO NLRP3 mostró resultados bastante reveladores. En un ensayo de actividad SOD, los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa de la actividad de hasta $0,58\pm 0,02$ ($p\leq 0,01$) en muestras *NLRP3^{-/-}* VJ (Control WT VJ $1,77\pm 0,05$) (**Figura 34**). En ratones jóvenes también se produjo una disminución significativa de la actividad SOD, con valores de $0,76\pm 0,09$ ($p\leq 0,05$) en el grupo *NLRP3^{-/-}* JO (Control WT JO $1,24\pm 0,06$) (**Figura 34**).

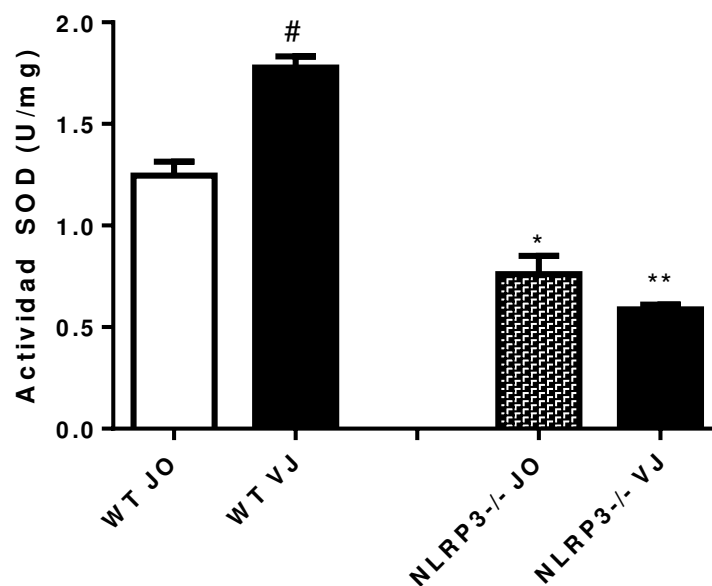


Figura 34. Nivel de actividad SOD en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y controles WT, tras un período de 20 meses. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=2$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha \alpha p \leq 0,01$ / $\alpha \alpha \alpha p \leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* JO vs *NLRP3^{-/-}* VJ.

Los niveles proteicos del marcador de estrés oxidativo PTPRG se redujeron de manera significativa tanto en ratones jóvenes como viejos, siendo este descenso proteico más acusado en estos últimos, con valores de $0,66 \pm 0,0006$ ($p \leq 0,01$) en el grupo *NLRP3^{-/-}* VJ (Control WT VJ $1,27 \pm 0,04$) (**Figura 35**). En ratones jóvenes también se obtuvieron niveles proteicos reducidos de PTPRG, con valores de hasta $0,89 \pm 0,08$ ($p \leq 0,05$) en el grupo *NLRP3^{-/-}* JO (Control $1,41 \pm 0,12$) (**Figura 35**).

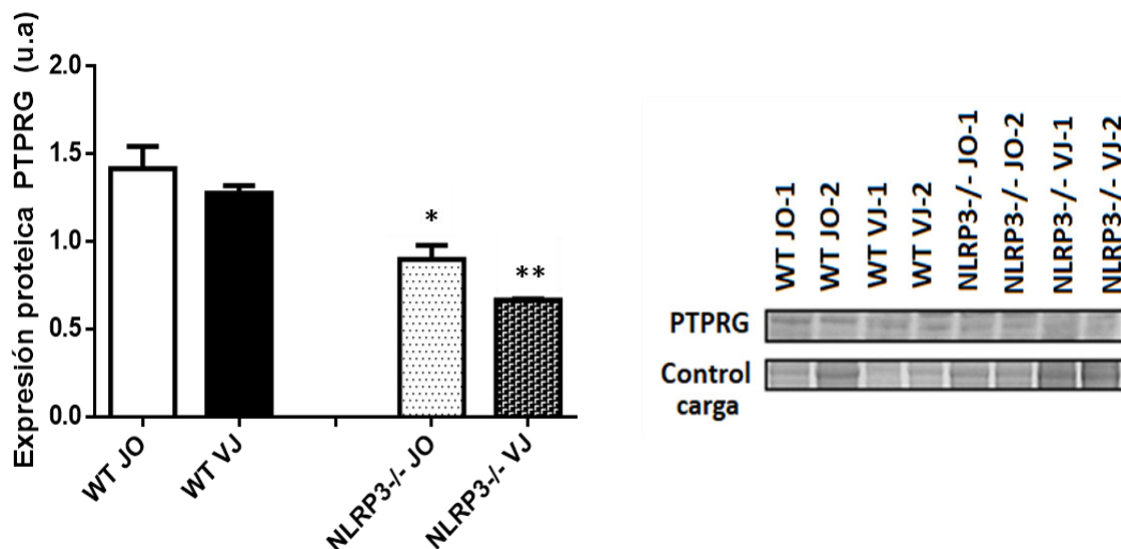


Figura 35. Niveles de expresión proteica del marcador de estrés oxidativo PTPRG en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y controles WT, tras un período de 20 meses. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 2$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ NLRP3^{-/-} (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha \alpha p \leq 0,01$ / $\alpha \alpha \alpha p \leq 0,001$ NLRP3^{-/-} JO vs NLRP3^{-/-} VJ.

4.4.4. La ausencia del complejo NLRP3 inflammasoma mejora los niveles de marcadores fibróticos en ratones KO NLRP3

La tinción tricrómica de Masson mostró el grado de daño hepático por depósito de fibras de colágeno (**Figura 36**). Se observó una menor acumulación de fibras de colágeno tipo I teñidas en color azul en aquellas muestras de tejido de ratones KO NLRP3 (**Figura 36, Tinción Masson**). La apariencia de los hígados fue normal en todos los casos (**Figura 36, hígados de ratón**).

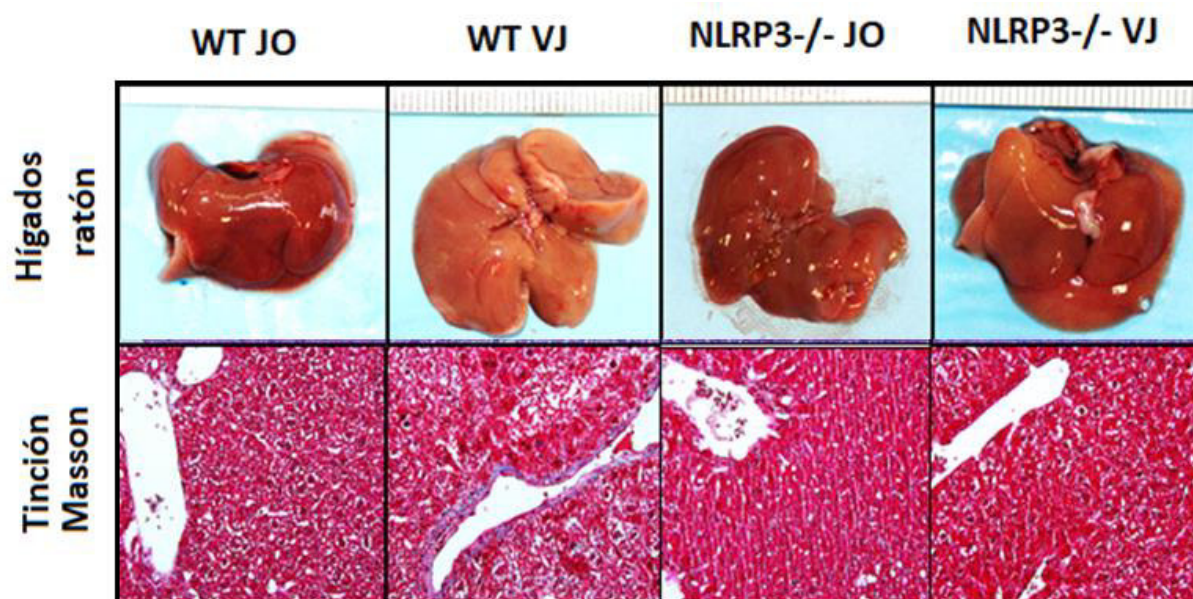


Figura 36. Análisis histológico del daño en el hígado en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y controles WT, tras un período de 20 meses. Tinción tricrómica de Masson; Hígados de ratón.

Los datos de expresión de proteínas en muestras de tejido hepático mostraron niveles proteicos reducidos del marcador fibrótico COL-1- α -1 en ratones del grupo *NLRP3^{-/-}* JO con valores de $0,90 \pm 0,11$ (Control $1,30 \pm 0,05$) (**Figura 37**). Esta reducción también se observó en los grupos de ratones viejos, aunque mostrándose una diferencia menor entre aquellos ratones del grupo *NLRP3^{-/-}* VJ ($1,06 \pm 0,10$) y su control WT VJ ($1,30 \pm 0,05$) (**Figura 37**).

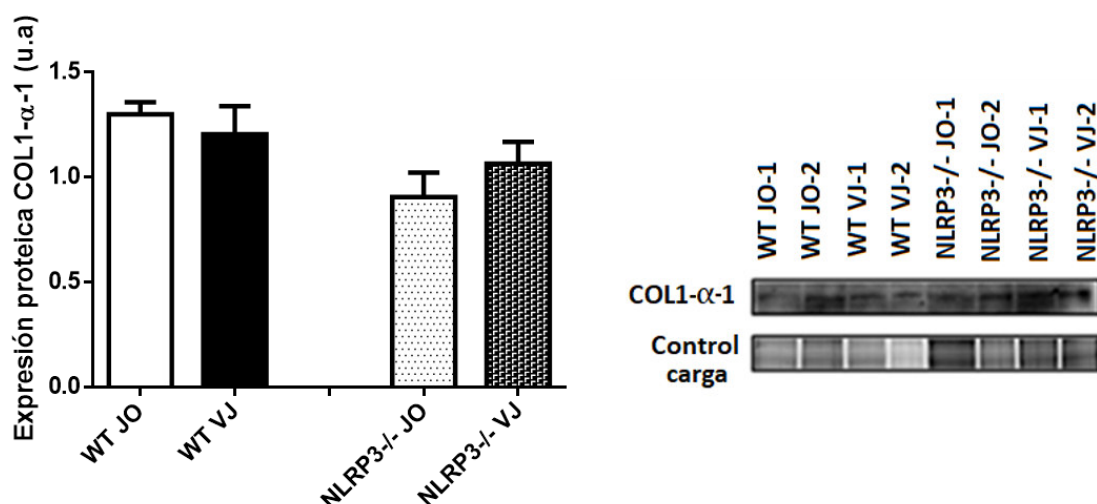


Figura 37. Niveles de expresión proteica del marcador de fibrosis hepática COL-1-α-1 en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y controles WT, tras un período de 20 meses. Todos los datos se expresan como la media± SEM ($n=2$ por grupo). * $p\leq 0,05$ / ** $p\leq 0,01$ / *** $p\leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); # $p\leq 0,05$ / ## $p\leq 0,01$ / ### $p\leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p\leq 0,05$ / $\alpha\alpha p\leq 0,01$ / $\alpha\alpha\alpha p\leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* JO vs *NLRP3^{-/-}* VJ.

Se observó una leve, aunque no significativa, disminución de los niveles proteicos del marcador fibrótico TPM2β en aquellos ratones que carecían del complejo NLRP3, tanto en ratones jóvenes como viejos. Los valores proteicos de TPM2β fueron prácticamente similares entre ratones del grupo *NLRP3^{-/-}* JO ($0,90\pm 0,13$) y sus respectivos controles (Control WT JO $0,92\pm 0,06$) (**Figura 38**). Se observó una mayor reducción en ratones *NLRP3^{-/-}* VJ, con niveles de $0,96\pm 0,13$ (Control $1,28\pm 0,17$) (**Figura 38**).

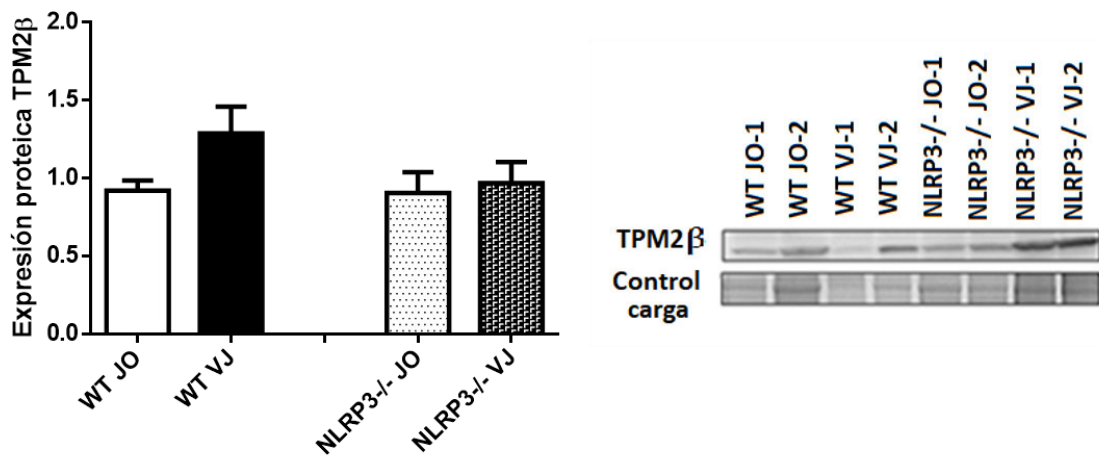


Figura 38. Niveles de expresión proteica del marcador de fibrosis hepática TPM2β en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3^{-/-}*) y controles WT, tras un período de 20 meses. Todos los datos se expresan como la media± SEM ($n=2$ por grupo). $*p\leq 0,05/ **p\leq 0,01/ ***p\leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); $\#p\leq 0,05/ \##p\leq 0,01/ \###p\leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p\leq 0,05/ \alpha\alpha p\leq 0,01/ \alpha\alpha\alpha p\leq 0,001$ *NLRP3^{-/-}* JO vs *NLRP3^{-/-}* VJ.

Finalmente, los niveles del factor protector GATA4 aumentaron en ratones *NLRP3^{-/-}*, alcanzando niveles de $1,19\pm 0,17$ en ratones del grupo *NLRP3^{-/-}* JO (Control WT JO $0,82\pm 0,13$) y niveles de $1,33\pm 0,04$ en ratones del grupo *NLRP3^{-/-}* VJ (Control WT VJ $0,72\pm 0,11$) (**Figura 39**).

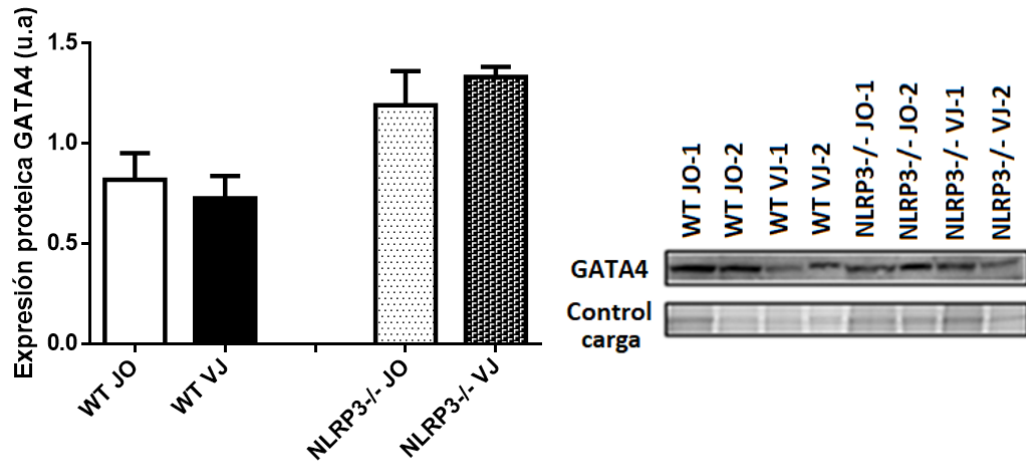


Figura 39. Niveles de expresión proteica del marcador de fibrosis hepática GATA4 en muestras de tejido hepático de ratones *knock-out* (KO) del complejo NLRP3 inflammasoma (*NLRP3*^{-/-}) y controles WT, tras un período de 20 meses. Todos los datos se expresan como la media \pm SEM ($n=2$ por grupo). * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ / *** $p \leq 0,001$ NLRP3^{-/-} (JO/VJ) vs WT (JO/VJ); # $p \leq 0,05$ / ## $p \leq 0,01$ / ### $p \leq 0,001$ WT JO vs WT VJ; $\alpha p \leq 0,05$ / $\alpha \alpha p \leq 0,01$ / $\alpha \alpha \alpha p \leq 0,001$ NLRP3^{-/-} JO vs NLRP3^{-/-} VJ.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades hepáticas, producidas como respuesta a lesiones hepatocelulares, pueden iniciarse por diversas causas, siendo algunas de las principales las protagonistas de este estudio, como la infección por VHC y la EHGNA. Tanto la infección por el virus de la hepatitis C como la enfermedad metabólica de EHGNA generan daños de estrés oxidativo e inflamación en los hepatocitos que terminan activando a las células estrelladas hepáticas e iniciando, por tanto, un proceso fibrogénico que agravan el daño hepático. En relación con estos procesos y a la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que los extractos enzimáticos acuosos de *Agaricus bisporus* (AbAEE) presentan capacidad inhibitoria frente a la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C, tanto en un ensayo *in vitro* como en células Huh7.5 infectadas con partículas virales, siendo compuestos de carácter polar y bajo peso molecular (<3kDa) los que presentan esta propiedad inhibitoria. Al mismo tiempo, estos compuestos bioactivos presentes en los extractos AbAEE son capaces de revertir la fibrosis hepática, presentando además efectos antioxidantes y antiinflamatorios, tanto en células LX2 como en un modelo animal de ratón KO LDLr con dieta alta en grasa, que simula la EHGNA. La regulación de las vías inflamatorias por parte de los extractos AbAEE parece ser clave en la modulación del resto de procesos fibróticos y oxidativos, lo cual se deduce de los resultados obtenidos de un modelo animal de ratón KO NLRP3. Aquellas muestras hepáticas procedentes de ratones KO NLRP3, muestran niveles reducidos de marcadores de metabolismo lipídico, de fibrosis, de estrés oxidativo e inflamación, siendo este resultado más acusado en ratones viejos, los cuales, a pesar de presentar mayor daño hepático por un proceso de envejecimiento, muestran una mejoría acrecentada en comparación con los ratones jóvenes.

El tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C ha progresado considerablemente en los últimos años, pero a pesar de la eficacia de los antivirales sobre diversas proteínas, como la proteasa NS3/4A, NS5A o NS5B, el VHC sigue siendo evasivo en algunas poblaciones, en

ocasiones debido a la posible reinfección tras la cura ^{131–133}. Existe una necesidad de desarrollar una vacuna eficaz contra el VHC, reto que se ve obstaculizado por la falta de un buen modelo para la enfermedad, diversidad genómica del VHC, la alta tasa de mutación y el desarrollo de partículas lipovirales infecciosas ¹³⁴. A pesar de ello, en España se ha puesto en marcha una iniciativa a nivel nacional denominada Plan Estratégico Nacional para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC), el cual ha permitido tratar con AAD a 132.000 pacientes, teniendo una tasa de curación superior al 97 %. Sin embargo, aún existen muchos países, incluidos los de Europa, que necesitan un plan global para facilitar la eliminación de la hepatitis C. En este contexto, tratamientos naturales preventivos y de uso profiláctico se posicionan como nuevas alternativas no tóxicas a la infección por VHC, con el objetivo de evitar las complicaciones del hígado relacionadas con esta enfermedad, como la necroinflamación hepática o la fibrosis, mejorando la calidad de vida de los pacientes ⁷⁸. En este sentido, los extractos acuosos enzimáticos de *Agaricus bisporus*, de acuerdo con los datos obtenidos, pueden dar sentido a la idea de un tratamiento natural preventivo frente a la infección por VHC. Los resultados presentados en este trabajo muestran unos niveles de toxicidad de los extractos AbAEE prácticamente ausentes, tanto en células hepáticas (LX2 y Huh7.5) (Tablas 8 y 9) como en un modelo animal de rata (Tabla 10). Una de las contraindicaciones que presentan los antivirales de VHC es la toxicidad en determinadas situaciones y con cierto tipo de pacientes. Existen inhibidores de la proteasa NS3/4A como paritaprevir, potenciado con ritonavir, grazoprevir, glecaprevir o voxilaprevir, que pueden ser sustancialmente tóxicos en pacientes con un daño hepático crónico más agudo secundario a cirrosis ⁷⁸. Los extractos AbAEE son totalmente inocuos, pues dosis de 5000 mg de AbAEE/kg de peso de rata mostraron parámetros totalmente normales en todos los grupos tratados, tanto tras las primeras horas de tratamiento como en los 14 días consecutivos de seguimiento. Estos resultados respaldan la seguridad de la administración oral de los extractos AbAEE respecto a su uso como alimento funcional.

Son diversos los trabajos que apoyan la presencia de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos en extractos naturales de plantas y hongos. Un reciente estudio realizado con el extracto crudo de *Juncus maritimus* Lam, una planta acuática perteneciente a la familia de las juncáceas, ha mostrado propiedades antivirales frente al VHC en cultivos celulares ¹³⁵. En concreto, el dehidrojuncusol es el compuesto activo aislado que muestra actividad antiviral, no mostrando toxicidad alguna, y siendo su molécula diana la proteasa NS5A del VHC de diferentes genotipos. En cuanto a los hongos, se conocen sus propiedades inmunomoduladoras, antitumorales y hepatoprotectoras. Un estudio realizado con extractos del hongo *Lentinula edodes* demostró su composición en moléculas bioactivas, como compuestos polifenólicos, que manifestaban las propiedades citadas anteriormente ¹³⁶. Concretamente, la lignina fue el compuesto responsable del efecto hepatoprotector, inhibiendo la entrada del virus HCV en células Huh7.5 infectadas con partículas virales. Estos datos demuestran el potencial de los tratamientos naturales frente a las enfermedades hepáticas, los cuales son reforzados con los resultados obtenidos en este estudio. En concreto, el análisis fluorimétrico para la medida de actividad de la proteasa NS3/4A del VHC (genotipo 1b) indicó que fracciones de bajo peso molecular, en concreto, inferiores a 3 kDa, mostraron niveles de actividad proteasa muy bajos, del 23,7 %, siendo por tanto el grado de inhibición de un 76,3 % en comparación con el control positivo telaprevir (Figura 13). Las fracciones de mayor peso molecular (UF-20 kDa y UF-100kDa) y el extracto enzimático completo, AbAEE, también mostraron niveles de inhibición bastante altos, en concreto de un 66,8%, 47,1 % y 49,59 % respectivamente (Figura 13). Esto es indicativo de que las propiedades hepatoprotectoras no se limitan únicamente a las fracciones de menor peso molecular, pero sí que, en una búsqueda de los componentes más activos en esta inhibición viral, son las fracciones UF-3kDa las candidatas para la caracterización y su uso en el tratamiento profiláctico frente al VHC. De hecho, no es extraño que los mayores niveles de inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC estén presentes en estas fracciones de bajo peso molecular, ya que son los

oligoglucanos, oligopéptidos y metabolitos secundarios con propiedades inmunomoduladoras, los que se encuentran dentro de este rango de peso molecular ¹³⁷⁻¹³⁹. La composición de los hongos del género *Agaricus*, como demuestran los resultados de este estudio y de otras recientes investigaciones, es rica en componentes potencialmente capaces de inhibir la replicación del VHC, sobre todo aquellos que se encuentran en el cuerpo fructífero, rico en glucanos (α y β), quitina, proteínas, polifenoles, antioxidantes, vitaminas, metabolitos secundarios, etc. Así, los β -glucanos, polifenoles y ergotioneínas podrían actuar activando vías aún no bien definidas implicadas en frenar el ciclo de vida del virus ⁹⁸. El carácter hidrofílico de todos estos compuestos es de notable importancia, pues de un segundo análisis fluorimétrico de actividad NS3/4A del VHC (genotipo 1b) para fracciones de *AbAEE* obtenidas por ELL en diferentes disolventes orgánicos, los resultados mostraron una disminución, en torno al 85-90 %, de los niveles de actividad proteasa, en presencia de fracciones de peso molecular <3kDa y reconstituidas en disolventes polares, como agua, acetato de etilo y diclorometano (Figura 14). Niveles más altos de actividad proteasa se encontraron en presencia de fracciones reconstituidas en disolventes apolares, como hexano, apoyando la idea del carácter hidrofílico de los compuestos inhibidores de los extractos, teoría reforzada con los datos de inhibición de las fracciones más polares, de hasta un 87,7 %, 83,6 % y 78,9 % en fracciones AcF-3kDa, DMF-3kDa y AEF-3kDa, respectivamente (Figura 14). La caracterización preliminar hecha hasta el momento indica, por tanto, que son compuestos de bajo peso molecular y carácter polar aquellos que muestran los mayores niveles de inhibición frente a la proteasa NS3 /4A del VHC. El centro activo de la proteasa NS3 está constituido, principalmente, por una tríada catalítica de tres aminoácidos: Ser195, His57 y Asp102, formando un sitio de unión hidrofílico, mediante enlaces covalentes, con el sustrato concreto. La estrategia para la inhibición de las serina-proteasas es la de formar un enlace intermedio covalente con el residuo de serina catalítica, siendo componentes hidrofílicos los inhibidores que se acoplarían al centro activo de esta enzima ¹⁴⁰. Además, se conoce que estos inhibidores deben ser pequeñas moléculas que

puedan amoldarse a dicho sitio activo ¹⁴¹. De esta forma, se justifica y se apoyan los datos obtenidos en este estudio, pudiendo contener estas fracciones AcF-3kDa obtenidas de los extractos *AbAEE* el potencial inhibitorio frente a la proteasa del VHC. De hecho, la caracterización química realizada en colaboración con el grupo de la Prof. Dra. María Dolores Luque de Castro, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba (Campus Universitario de Rabanales) revela posibles compuestos con dichas características que podrían actuar como inhibidores específicos de la proteasa NS3/4A del VHC, sobre los cuales se discutirá más adelante. La efectividad de estos extractos *AbAEE* frente a la inhibición de la actividad NS3/4A del VHC no sólo se limita al genotipo 1b, sino que se ha podido observar su efecto bloqueante en diferentes genotipos del VHC. De este modo, y observando los resultados de las figuras 15 y 16, se demuestra como las fracciones AcF-3kDa, así como los extractos completos *AbAEE*, fueron capaces de inhibir la actividad proteasa NS3/4A de los genotipos 2a y 3a. Concretamente, las fracciones AcF-3kDa alcanzaron niveles del 80,33 % y del 72,91 % de inhibición de la proteasa NS3/4A del VHC de los genotipos 2a y 3a, respectivamente. La prevalencia de los diferentes genotipos del VHC es distinta en función de la zona geográfica. En el caso concreto de España, y a pesar de que el genotipo 1b es el más prevalente (42,4 %), existe una prevalencia del 18,6 % del genotipo 3 y del 4,6 % del genotipo 2 ¹⁴². La infección por VHC de estos dos últimos genotipos, aunque menor, está presente, siendo importante diseñar un tratamiento que abarque, no sólo aquel genotipo más prevalente, sino otros con menor incidencia, aunque de riesgo. De esta manera, los compuestos presentes en los extractos de *Agaricus bisporus* podrían competir o complementar las terapias con los fármacos sintéticos actuales ⁷⁸. Cabe añadir que, sumado al alto porcentaje de inhibición de la actividad enzimática en presencia de los extractos *AbAEE*, tiene además la ventaja de purificación simple y rápida, lo cual no comprometería el precio económico.

El principal problema del VHC, como ya se ha nombrado anteriormente, es la carencia de un buen modelo que simule la enfermedad completa. Este hecho dificulta la obtención de vacunas que

puedan prevenir la infección por el virus. A pesar de ello, existe un modelo *in vitro* en células Huh7.5 transfectadas con ARN JFH-1 (VHC genotipo 2a) que ha sido utilizado en este estudio para valorar la efectividad de los extractos de *Agaricus bisporus* en la inhibición de la replicación viral. Los niveles de ARN del VHC, tanto intracelulares como extracelulares, se redujeron en comparación con el control cuando las células fueron tratadas con los extractos AbAEE (Figuras 17 y 18), hasta alcanzar niveles de inhibición del 93,3 % en ARN intracelular, y 39,7 % en ARN extracelular. Estos resultados son consecuencia directa de la inhibición de la replicación del genoma del VHC. Los virus, como es el caso del VHC, tiene una fase extracelular en la cual, al no presentar enzimas para un metabolismo propio, son inertes, mientras que en la fase intracelular, ayudándose de la célula huésped, comienzan la traducción de ARN y procesamiento de las distintas proteínas necesarias para su replicación⁶. El hecho de que los niveles de ARN intracelular sean mínimos en presencia de AbAEE indica que el extracto tiene la capacidad de inhibir el proceso replicativo del virus, pudiendo estar bloqueando la traducción de éste a las diferentes proteínas implicadas en el proceso de replicación viral. Por su lado, los niveles extracelulares del virus son un poco más altos en presencia del extracto AbAEE, lo cual puede explicarse por un bloqueo de la entrada del virus al interior celular para la traducción del ARN y el procesamiento de la poliproteína. Para comprobar esta posible teoría, los niveles proteicos de la proteasa NS3/4A y del núcleo o *core* fueron analizados en células Huh7.5 infectadas con partículas virales y tratadas con AbAEE. Los resultados, observados en la figura 19, muestran niveles de NS3 reducidos de hasta de 0,02 y del core de hasta 0,08 en comparación con el control cuando las células fueron tratadas con los extractos. Estos datos demuestran la teoría planteada anteriormente, pues el extracto AbAEE tiene la capacidad de inhibir la replicación del virus y la traducción de su ARN a proteínas como la NS3 o el núcleo, cuyos niveles proteicos son mínimos.

Todos los resultados hasta ahora discutidos muestran el potencial inhibitorio frente a la replicación viral que presentan los extractos de AbAEE, en concreto inhibiendo a la proteasa NS3/4A del VHC

(genotipos 1b, 2a y 3a). Una caracterización preliminar mostraba que son compuestos de un peso molecular inferior a 3 kDa y de carácter hidrofílico los candidatos a inhibidores. Para conocer cuáles son aquellos compuestos presentes en las fracciones que han dado resultados positivos de altos grados de inhibición de la proteasa, se realizó un análisis por LC/MS-QTOF con el fin de reconocer todos y cada uno de los componentes de estos extractos. El análisis indicó cinco componentes comunes en todas las fracciones que mostraron capacidad inhibitoria frente a la proteasa NS3. De todos ellos se destaca la ergotioneina, un antioxidante que, junto con el glutatión, se presenta en mayor abundancia en los champiñones, sobre todo en la especie *Agaricus bisporus*¹⁴³. En concreto, los champiñones contienen, al ser fuente primaria de ergotioneina, entre 0,4-2,0 mg/ g (peso seco). En los seres humanos, la presencia de ergotioneina en sangre es dependiente de la dieta, ya que nuestro organismo no presenta la capacidad de sintetizarla. Se ha demostrado que la biodisponibilidad de la ergotioneina tras el consumo de champiñones es bastante alta, actuando como antioxidante, debido a un componente de azufre que presenta esta función¹⁴⁴. Profundizando un poco más en la caracterización de los extractos, se encontraron cuatro compuestos presentes únicamente en las fracciones AcF-3kDa y UF-3kDa, las cuales mostraron los máximos niveles de inhibición de la proteasa. Debido a ello, estos compuestos pueden ser propuestos como potentes candidatos con propiedades inhibitorias de la replicación del VHC. Entre éstos destaca el ácido succínico, del cual se ha demostrado que presenta actividad inhibitoria frente a la proteasa del VHC¹⁴⁵. En concreto se ha encontrado que las antrodinas, compuestos derivados del ácido succínico y extraídos del hongo *Antrodia cinnamomea*, mostraron una potente actividad inhibitoria frente a dicha proteasa, por lo que, junto con el resto de los compuestos analizados y descritos anteriormente, podría formar un complejo de metabolitos capaces de actuar frente a la replicación viral. Todos los resultados mostrados hasta el momento indican, a pesar de que la caracterización y purificación del posible inhibidor o inhibidores no está completamente resuelta, que en extractos AbAEE, concretamente en fracciones hidrofílicas y de bajo peso

molecular, existen compuestos con propiedades antivirales capaces de bloquear la replicación del VHC al inhibir a la proteasa NS3/4A de diferentes genotipos virales.

Sumado a las propiedades antivirales de los extractos *AbAEE*, investigamos los efectos antifibróticos, antiinflamatorios y antioxidantes de los mismos, tanto en células LX2 como en un modelo animal de ratón con daños por enfermedad metabólica (EHGNA) en etapas avanzadas, los cuales han sido inducidos por una dieta alta en grasa ¹⁴⁶. Las múltiples propiedades medicinales de los hongos se conocen desde hace miles de años, y ha sido en esta última década cuando el estudio de sus compuestos biológicamente activos ha comenzado a cobrar mayor importancia. Tal y como se ha descrito para el caso de la hepatitis C, entre estos compuestos bioactivos se encuentran polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos con capacidad inmunomoduladora, antitumoral, antiglucémica y hepatoprotectora, convirtiendo a los hongos en verdaderos alimentos funcionales ¹¹⁴. Las funciones hepáticas de los champiñones han sido objetivo de numerosas investigaciones, de las cuales se ha demostrado que ejercen un papel reparador de los hepatocitos ante un daño hepático, como aquel generado dentro de la EHGNA. De hecho, un estudio realizado en ratonas ovariectomizadas (modelo animal de mujeres post-menopáusicas), las cuales presentan un mayor riesgo a desarrollar EHGNA por la reducción de niveles de estrógeno, ha revelado que el suplemento con extractos de *Agaricus bisporus* en la dieta reduce los niveles de marcadores de daño hepático, mejorando la capacidad de eliminación de la glucosa y reduciendo la acumulación de grasa en el hígado ¹⁴⁷. La acumulación lipídica se presenta como el primer paso para el desarrollo de la EHGNA, ya sea por una ingesta excesiva de grasa u otros desórdenes metabólicos, para generar, a continuación, un daño por estrés oxidativo, peroxidación lipídica e inflamación hepática. Estos procesos concluyen con la activación de las células estrellas hepáticas, las cuales están implicadas en el desarrollo de fibrosis ¹⁴⁸. El análisis de marcadores representativos de cada uno de estos procesos se hace necesario para valorar la función hepatoprotectora de los extractos *AbAEE* en el daño por fibrosis hepática enmarcado dentro de la EHGNA. De este modo, y usando

células estrelladas hepáticas activadas (LX2) tratadas con *AbAEE*, demostramos que los extractos de champiñón reducen marcadores de fibrosis hepática, así como de estrés oxidativo, en comparación con los controles. En concreto, y centrándonos en el proceso fibrótico, las células LX2 tratadas con *AbAEE* a una concentración de 0,2 mg/mL redujeron significativamente los niveles génicos y proteicos de COL-1 α -1 hasta niveles de 0,14 y 0,47, respectivamente, en comparación con el control (1) (Figura 20), sugiriendo una capacidad antifibrótica del extracto. Un posible mecanismo de acción por el cual los compuestos bioactivos de los extractos *AbAEE* disminuyen los niveles de estos marcadores fibróticos en células LX2, puede ser debido a una inhibición del factor TGF- β 1, debido a su implicación en la activación de las CEH en estado quiescente^{148–150}. Esta hipótesis es apoyada por un estudio llevado a cabo en células CFSC-8B tratadas con extractos de *Antrodia camphorata*, un hongo con composición similar a *Agaricus bisporus*, en el cual se observó una reducción de los depósitos de colágeno-I y colágeno-III inducidos por el factor de crecimiento TGF- β 1 y los inhibidores de metaloproteinasas^{151,152}. En este mismo estudio realizado con células CFSC-8B, se demostró que el tratamiento con los extractos de hongo de composición similar a *Agaricus bisporus*, reducía los niveles de actina-2 α y fibronectina, cuyo depósito se inducía por TGF- β 1^{151,152}. Nuestros resultados también mostraron niveles génicos reducidos de manera significativa de *actina-2 α* cuando las células LX2 fueron tratadas con *AbAEE*, alcanzándose niveles mínimos de 0,007 y 0,07 a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL, respectivamente (Figura 21). Al mismo tiempo, otro marcador fibrótico, *Tpm2 β* , reducía sus niveles génicos de manera significativa a la concentración de 0,2 mg/mL de *AbAEE*, con niveles de 0,02 en comparación con el control (1) (Figura 21). Estos datos se vieron reforzados con el análisis de expresión del factor de transcripción GATA4, cuyo incremento en sus niveles se correlaciona con una reducción del estado fibrogénico⁷⁴. Incrementos de los niveles génicos de *GATA4* de hasta 2,62 y 1,46 con respecto al control, y niveles proteicos de hasta 1,45 y 1,72 en comparación con sus controles (1), a concentraciones de 0,2 y 1 mg/mL, respectivamente,

señalaron nuevamente el poder antifibrótico de los extractos (Figura 22). Es importante señalar que los mejores resultados se obtuvieron a bajas concentraciones del extracto *AbAEE* (0,2 mg/mL) en la mayoría de estos experimentos. Este hecho puede explicarse por un efecto de hormesis, es decir, un fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación o mejores resultados positivos a dosis menores ¹⁵³.

La sobreproducción del anión superóxido, radicales hidroxilos y especies reactivas de nitrógeno resultan en un proceso de estrés oxidativo que acentúa el daño hepático enmarcado en la EHGNA derivada a fibrosis. Este daño por estrés oxidativo permite la modificación bioquímica de reguladores celulares clave, induciendo respuestas inflamatorias y promoviendo una mayor activación de las CEH y mayor gravedad de la EHGNA ¹⁵⁴. El tratamiento con *AbAEE* en células LX2 produjo redujo significativamente los niveles génicos de los marcadores *Sod2* y *Nos2*, tanto a concentraciones de 0,2 y de 1 mg/mL (Figuras 23 y 24), observando de nuevo el efecto de hormesis al obtener niveles de expresión génica menores para la concentración más baja de 0,2 mg/mL. La actividad inmunomoduladora y antioxidante que presentan los hongos, y, en concreto, los champiñones del género *Agaricus bisporus*, a través de la cual se regula la homeostasis oxidativa y se mejoran los sistemas de defensa, parece atribuirse a polifenoles, polisacáridos, vitaminas, carotenoides y minerales ¹⁵⁵. Uno de los compuestos bioactivos más potentes presentes en estos extractos, el cual ya se ha descrito anteriormente en relación con la inhibición de la proteasa del VHC, es la ergotioneina. En concreto, la ergotioneina muestra un papel específico de protección frente daño de ADN mitocondrial causado por la generación del anión superóxido ^{156,157}, datos que se combinarían con los resultados obtenidos y ya descritos de disminución de niveles génicos *SOD2* ante el tratamiento con *AbAEE*, fuente primaria indiscutible de este antioxidante. El efecto hepatoprotector que ejercen los extractos se reflejaría, por tanto, en un menor daño de ADN mitocondrial y peroxidación lipídica. Relacionado con esto último, recientes estudios han posicionado a la ergotioneina presente en extractos crudos de champiñones del

género *Pleurotus*, de composición similar al género *Agaricus*, como compuestos antioxidantes capaces de controlar los efectos de peroxidación lipídica de liposomas, reduciendo la formación de hidroperóxido lipídico y protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados de la degradación ¹⁵⁸.

Estos resultados de un análisis *in vitro* se vieron apoyados por los obtenidos en los estudios *in vivo* con ratones KO del receptor LDL y alimentados con una dieta alta en grasa, los cuales desarrollan daños hepáticos similares a los generados durante la EHGNA. Muestra de ello es que todos los ratones desarrollaron obesidad inducida por la dieta alta en grasa, aunque no se observaron diferencias significativas en el peso corporal entre aquellos ratones HFD45 (45 % contenido en grasa) y los ratones HFD60+AB (60 % del contenido en grasa) (Figura 25A y 25B), a pesar del mayor contenido en grasa de este último. La diferencia de contenido calórico entre los grupos HFD45 sin tratar y HFD60+AB con suplemento de *AbAEE* en la dieta no limita los estudios realizados en estos grupos de ratones, ya que ambos son comparables a pesar de dicha diferencia calórica. Se ha demostrado que una dieta HFD con un 45 % de contenido en grasa es suficiente para desarrollar daño hepático y cardiovascular en este modelo de ratón ¹⁵⁹, estableciéndose como un buen grupo control. Sin embargo, una dieta HFD con un 60 % del contenido calórico provoca un desarrollo progresivo de esta enfermedad hacia un estado avanzando ¹⁶⁰, agravando el daño hepático en los animales que no estén suplementados con algún tratamiento paliativo frente al mismo, como es el caso del suplemento con *AbAEE*. Por tanto, una dieta con un porcentaje calórico mayor (HFD60) + *AbAEE* permite, por un lado, la posibilidad de mostrarse como grupo experimental no control, y por otro, que los buenos resultados derivados de las propiedades beneficiosas de los extractos, sean aún más contundentes por estar paliando un daño de mayor grado que los provocados en el grupo control. Es un hecho obvio que los ratones alimentados con una dieta baja en grasa o LFD alcanzaron un peso corporal inferior aquellos alimentados con una dieta HFD. Lo interesante aparece al comparar los dos grupos de ratones suplementados con este último tipo de dieta alta en grasa. Ambos grupos presentan un alto peso corporal, y, a pesar de que

el grupo tratado con *AbAEE* contiene un porcentaje de grasa mayor que el grupo control, el peso de éstos no varía respecto a los ratones no tratados con extractos y que, además, cuentan con una dieta con un 15 % menos de contenido en grasa. Esto sugiere que los extractos *AbAEE* podrían actuar como un agente reductor de la adiposidad, previniendo la ganancia de peso. De hecho, recientes estudios sugieren efectos beneficiosos frente a la obesidad de numerosos champiñones. En concreto, se ha demostrado la función protectora de *Agaricus bisporus* en alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa, reduciendo el daño hepático de una manera dosis dependiente y disminuyendo la esteatosis hepática en los ratones alimentados con extractos de *Agaricus bisporus* ^{161,162}. La acumulación lipídica es considerada generalmente un factor inicial y causal en la progresión de esteatosis a NASH ³⁹. Recientes estudios en modelos animales han revelado una estrategia terapéutica frente a la fibrosis hepática y la acumulación lipídica a través de la acción de abundantes flavonoides en champiñones, como la quercetina. La quercetina presenta actividad antioxidante y la capacidad de reducir los niveles lipídicos en suero y en el tejido hepático, reprimiendo la expresión de la enzima DGAT1, la cual está implicada en la formación de triglicéridos ¹⁶³. Aunque los resultados obtenidos referentes al grado de esteatosis no mostraron una reducción de ésta con el tratamiento de *AbAEE* (Figura 28A, panel tinción H&E), los principales parámetros fisiopatológicos sí mejoraron con el suplemento de champiñones, a pesar de los daños causados por la dieta HFD60. De hecho, los niveles séricos de GOT/AST, uno de los marcadores bioquímicos considerados como indicadores efectivos para el daño hepático temprano ¹⁶⁴, no variaron entre el grupo control HFD45 y el tratado HFD60+AB, a pesar del mayor porcentaje de grasa de este último (Figura 25D), demostrando un papel protector de los extractos. En un estudio similar llevado a cabo en ratas y en un modelo animal de ratón, se mostró una reducción de los niveles de transaminasas en aquellos animales con una dieta suplementada con extractos de champiñón ¹⁶⁵.

Los resultados obtenidos tras el análisis *in vivo* de marcadores fibróticos reiteraron los derivados del estudio *in vitro* con células LX2. Concretamente, la acumulación de las fibras de colágeno en las secciones hepáticas indicó una reducción del grado fibrótico en los grupos tratados con extractos *AbAEE* (Figura 28A, panel tinción Sirius red y Figura 28B), del mismo modo que se disminuyeron los niveles génicos de *Col-1 α -1* de manera significativa en los tejidos hepáticos homogeneizados de ratones tratados con *AbAEE* (Figura 26A). En cuanto a los niveles de GATA4, no se observó un incremento de células estrelladas hepáticas positivas en GATA4 (Figura 28A, panel tinción GATA4 y Figura 28C) en las secciones hepáticas tratadas con *AbAEE*, pero la reducción células positivas GATA4 en el grupo HFD60+AB no fue significativa comparada con el grupo LFD+AB, pese al mayor porcentaje de grasa y contenido calórico. A pesar de ello, los niveles de expresión génica de *Gata4* sí incrementaron significativamente en los ratones tratados con extractos respecto a los grupos control (Figura 26B).

Sorprendentemente, y a pesar del mayor grado de esteatosis observado en los grupos tratados con extractos *AbAEE*, según los resultados de tinción de H&E, no hubo ninguna respuesta inflamatoria severa, tal y como lo refleja la reducción en el número de células positivas MOMA2 en grupos tratados respecto a sus controles (Figura 29). En concreto, la reducción de este marcador en HFD60+AB en comparación con su control HFD45 fue más significativo debido al mayor contenido en grasa del primero, indicando el papel protector de los extractos. Un estudio en ratones diabéticos *db/db* mostró que la dieta con extractos de champiñón atenuó el daño hepático derivado de la EHGNA a través de la regulación del proceso inflamatorio, gracias a la supresión de producción del marcador pro-inflamatorio MCP1¹⁶⁶. Estos resultados se ven apoyados por los niveles génicos reducidos de los marcadores *Sod2* y *Nos2* en muestras de tejido hepático homogeneizados de ratones que fueron suplementados con *AbAEE* en su dieta (Figura 27). Una alta producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno induce una respuesta inflamatoria, características propias del daño fibrótico producido en una EHGNA. El tratamiento con extractos

de champiñón pudo bloquear la acumulación de especies oxidativas y, como consecuencia, la activación severa de un proceso inflamatorio. Previos estudios *in vivo* han revelado los efectos antioxidantes de los extractos de champiñones, incluyendo el género *Agaricus bisporus* ¹⁶⁷. Los champiñones son una fuente abundante de vitaminas así como antioxidantes y minerales con propiedades beneficiosas y protectoras ^{104,168}. Se ha demostrado que extractos de champiñones del género *Agaricus blazei* y *Pleurotus eryngii* disminuyeron los niveles de aminotransferasas plasmáticas, radicales libres, los niveles de la glutatión peroxidasa y los de la superóxido dismutasa ¹⁶⁹, reduciendo la peroxidación lipídica y la concentración de radicales libres. Estos datos derivan de la capacidad de regulación de la respuesta inmune del huésped ante un suplemento de champiñones en la dieta. De hecho, un reciente estudio ha demostrado que, en cerdos alimentados con una dieta suplementada con champiñones *Agaricus bisporus* durante seis semanas, se redujeron los niveles de la IL-1 β , implicada en la activación del complejo inflamatorio NLRP3, reduciéndose por tanto la actividad inflamatoria y modulando positivamente el metabolismo de la microbiota, asociada a una mejor salud intestinal ¹⁷⁰.

Del análisis de estos resultados relacionados con el proceso fibrótico enmarcado dentro de la EHGA, se demuestra la capacidad antifibrótica, antioxidante y antiinflamatoria de los extractos acuosos AbAEE. El tratamiento con AbAEE atenúa el daño hepático en células estrelladas hepáticas activas (LX2), además de en un modelo animal KO LDLr a pesar de la obesidad inducida por la dieta alta en grasa, derivándose estos efectos protectores de una regulación del proceso inflamatorio y del estrés oxidativo por parte de los extractos. Para profundizar en dicha hipótesis sobre el posible mecanismo de acción de los extractos a través de la regulación de la inflamación hepática, se hizo uso de un modelo animal KO del complejo inflamatorio NLRP3 con daño por envejecimiento.

El envejecimiento es un proceso caracterizado por la pérdida progresiva de la función tisular y orgánica debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno ¹⁷¹. Es frecuente que ocurra un

deterioro de la función hepática asociada a la edad, además de aparición de EHGNA, la cual puede progresar a fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma ¹⁷². En este sentido, la acumulación lipídica y lipotoxicidad, estrés oxidativo y la inflamación suelen jugar un papel importante en dicha progresión asociada al envejecimiento. Siendo el hígado el órgano responsable de mantener una homeostasis metabólica en el organismo, un desequilibrio de la misma debido, como en el caso que se describe, al envejecimiento, podría conducir a trastornos relacionados con la obesidad, como esteatosis, EHGNA y diabetes ¹⁷³. Por su parte, el complejo inflamasoma NLRP3, regulador de la activación de caspasa-1 y la maduración de la IL1 β , puede ser activado por diferentes mediadores, entre los que se incluye dicha alteración metabólica ¹⁷⁴. Existen diferentes estudios que aseguran la relación entre el complejo NLRP3 inflamasoma y las lesiones hepáticas, aumentándose la expresión del NLRP3 hepático y la caspasa-1, y generándose finalmente un proceso inflamatorio en el hígado ^{175,176}. De acuerdo con estos datos, un modelo animal de envejecimiento con daños equivalentes a los asociados a la EHGNA y fibrosis se presenta como buen modelo para el estudio de los distintos factores clave del daño hepático por esta enfermedad, como acumulación lipídica excesiva, estrés oxidativo y fibrosis hepática. Además, la supresión genética del complejo NLRP3 inflamasoma facilita el estudio deseado sobre la relación de estos daños y el proceso inflamatorio que ocurre hepático.

En un primer análisis para conocer el estado metabólico en el que se encontraban los distintos grupos controles de ratones jóvenes y viejos, se midieron los niveles de colesterol y glucosa en sangre (Figura 30). Como era de esperar, y debido al proceso de envejecimiento, aquel grupo de ratones viejos mostró mayores niveles de colesterol y glucosa en sangre comparado con el grupo control joven. Sin embargo, y reparando en los ratones KO NLRP3, se pudo observar un descenso significativo de los niveles de colesterol y glucosa en comparación con los controles, siendo esta bajada mucho más acusada en los grupos de ratones viejos. Este resultado aporta un indicio claro de la relación existente entre el proceso inflamatorio y el estado metabólico del organismo,

sentando las bases para profundizar en un estudio en el que la supresión del complejo NLRP3 en ratones jóvenes y viejos nos ayudaría a conocer en qué estado de activación se encuentran los distintos marcadores lipídicos, oxidativos y fibróticos. Por todo ello, y debido a que una de las principales causas de desarrollo de EHGNA y fibrosis hepática es la acumulación lipídica excesiva en hepatocitos, se estudiaron los distintos marcadores de metabolismo lipídico en ratones KO NLRP3 jóvenes y viejos.

Entre los diversos marcadores lipídicos existentes, la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos, MTP, presenta la capacidad, como su nombre indica, de transferir lípidos entre las diferentes vesículas de membranas, además de estar implicada en la regulación de la síntesis de colesterol ¹⁷⁷. Los niveles de MTP descendieron en aquellos ratones KO NLRP3, con una mayor diferencia respecto a su control el grupo de ratones viejos (Figura 31). Esta tendencia se repitió con otro marcador metabólico, ácido graso sintasa (FASN), implicada en la biosíntesis de ácidos grasos. Por una parte, su expresión proteica alcanzó niveles significativamente altos en el grupo WT VJ en comparación con el grupo WT JO (Figura 32). Estos datos coinciden con los de una reciente investigación en la cual diferentes grupos de ratones en un progresivo estado de envejecimiento, incrementaban sus niveles de ácidos grasos y triglicéridos de manera paralela a la mayor edad ¹⁷⁸. En cuanto a los grupos de ratones KO NLRP3, en especial el grupo de ratones viejos redujo significativamente los niveles proteicos de FASN en comparación con su control. Estos resultados hacen evidente la relación existente entre metabolismo lipídico y proceso inflamatorio. Finalmente, en el análisis del último marcador metabólico, la diacilglicerolacil transferasa (DGAT1), los resultados fueron algo diferentes. A diferencia de los marcadores anteriormente estudiados, los niveles proteicos de DGAT1 sólo se redujeron en aquellos ratones KO NLRP3 jóvenes, mientras que, en los ratones viejos, los niveles fueron mayores en el grupo KO NLRP3 en comparación a los controles (Figura 33). Cabe decir que, a pesar de este resultado, las diferencias entre los grupos de ratones viejos no fueron significativas, manteniéndose dentro

de unos niveles de expresión proteica que sobrepasaron ligeramente al control. El proceso de envejecimiento suele estar asociado a un incremento de los niveles de DGAT1, relacionándose una deficiencia de ésta en una mayor longevidad ¹⁷⁹. Es posible que el incremento en los niveles proteicos de DGAT1 asociado al envejecimiento sean tan altos que la supresión de NLRP3 no haya podido reducirlos por debajo del control, pero el leve incremento, como se apuntaba antes, no ha sido significativo.

La patogénesis de la EHGNA, como ya se ha descrito anteriormente, implica la activación del inflammasoma tras un daño por excesiva acumulación lipídica y alteración metabólica, acompañada de la liberación de especies reactivas de oxígeno. Al mismo tiempo, este estado de estrés oxidativo en el organismo se asocia al proceso de envejecimiento, produciendo una infiltración de neutrófilos y una generación de quimioquinas que, finalmente, activan a las células estrelladas hepáticas derivando en un proceso de fibrosis ¹⁸⁰. El análisis de los marcadores de estrés oxidativo en este modelo animal KO NLRP3, la actividad SOD incrementó significativamente, como era de esperar, en aquel grupo control de ratones viejos, en comparación con el grupo control de ratones jóvenes (Figura 34). La supresión del complejo NLRP3 inflammasoma redujo estos niveles en ambos grupos de ratones, siendo esta bajada mucho más acusada en el grupo de ratones viejos. El marcador PTPRG, otro marcador de estrés oxidativo, redujo los niveles proteicos en aquellos grupos de ratones KO NLRP3 con avanzada edad de una manera significativa en comparación a su control WT JV (Figura 35). Todo ello se relaciona finalmente con el estado fibrótico del hígado. En una situación de daño hepático con acumulación lipídica y estrés oxidativo en los hepatocitos, es fácil que se produzca la activación de las células estrelladas hepáticas con el inicio de un proceso fibrótico en el hígado. Tal y como ya apuntábamos anteriormente, el envejecimiento puede afectar a la patología hepática, agravando la sintomatología y los cambios ocurridos a nivel molecular. De hecho, un reciente estudio en el que ratas de edad avanzada fueron sometidas a un tratamiento con simvastatina o con PBS en aquellas control, resultó en que los animales control

envejecidos desarrollaban una forma severa de enfermedad hepática crónica avanzada, exacerbándose la hipertensión portal y la fibrosis hepática con una mayor muerte celular de los hepatocitos y una función más pobre. Además, las CEH se activaron y hubo una infiltración de macrófagos que agravó la enfermedad ¹⁸¹. Esto explica que en nuestros ratones controles de avanzada edad, los niveles proteicos del marcador fibrótico COL-1 α -1 incrementaran en comparación a aquellos en los que el complejo NLRP3 estaba suprimido, reduciéndose sus niveles, aunque no de manera significativa (Figura 37). Este mismo resultado se puede apreciar en la tinción tricrómica de Masson (Figura 36), en la cual los ratones controles viejos mostraron acumulación de fibras de colágeno teñidas en color azul, mientras que aquellos ratones KO NLRP3 VJ, la deposición de éstas se redujo. Estos datos se ven apoyados por un estudio en el cual, ratones a los que se les había inducido la activación de NLRP3 con tamoxifeno, mostraron una mayor esteatosis hepática y fibrosis, mientras que la supresión del complejo NLRP3 resultó ser protectora frente al desarrollo de estas afecciones hepáticas, acompañándose de una menor infiltración de macrófagos ⁶⁴. La implicación del inflammasoma en el desarrollo de fibrosis hepática parece evidente, más con resultados confirman esta hipótesis. El análisis del marcador fibrótico TPM2 β en ratones controles y KO NLRP3 resultó en niveles proteicos reducidos en aquellos ratones viejos a los que se les había suprimido el complejo inflammasoma, en comparación con sus controles (Figura 38). Del mismo modo, el factor protector GATA4 en ratones KO NLRP3 incrementó, tanto en ratones jóvenes como en los viejos, por encima de sus controles, indicando el papel protector que presentaba la supresión del complejo NLRP3 inflammasoma ante el daño hepático por fibrosis (Figura 39).

Hasta ahora, todos los resultados mostrados han ido dando respuestas al papel que juegan los extractos de champiñón en el tratamiento de afecciones hepáticas como la hepatitis C o la fibrosis hepática, las cuales son detonantes de una progresión del daño que podría agravarse hasta un carcinoma hepatocelular. Los virus de la hepatitis son los principales patógenos en el desarrollo

de un daño hepático, y la inflamación del hígado puede contribuir al desarrollo de una fibrosis hepática inducida por esta infección ^{182,183}. En este sentido, los extractos *AbAEE* podrían, no sólo inhibir la proteasa NS3/4A de VHC, como se aprecia en los resultados discutidos, sino regular el daño inflamatorio que deriva de la infección. Esta hipótesis podría estar apoyada por los resultados obtenidos en los experimentos con células LX2 y el modelo animal KO LDLr, en los cuales marcadores de estrés oxidativo e inflamación disminuían con el tratamiento de *AbAEE* respecto a los controles. De ahí a que la idea derivada de estos resultados sea que el tratamiento de los extractos *AbAEE* reduzca el daño hepático, y con ello los niveles de marcadores fibróticos, de estrés oxidativo e inflamación se vean disminuidos, a través de la regulación de la vía inflamatoria. Esto último se ha comprobado con los experimentos realizados en ratones KO NLRP3, cuyos resultados han mostrado que la supresión de este complejo inflamasoma mejora el daño al hígado, reduciendo marcadores de metabolismo lipídico relacionados con esteatosis, de estrés oxidativo y de fibrosis hepática.

A pesar de una caracterización inicial de los extractos, aún queda recorrido en la identificación concreta del conjunto de compuestos inhibidores de la proteasa NS3/4A del VHC. Sabemos que el peso molecular de estos componentes es inferior a 3 kDa, mostrando características hidrofílicas, y siendo algunos de los candidatos el antioxidante ergotioneína y el ácido succínico. Es difícil conocer si los compuestos identificados en los extractos como posibles candidatos a inhibidores de la proteasa del VHC, también juegan un papel en el efecto antifibrótico, antioxidante y antiinflamatorio que poseen. A colación de este tema, en un reciente estudio se ha analizado el papel antioxidante de un inhibidor de proteasa obtenido concretamente del champiñón común *Agaricus bisporus*. En concreto, se probó el efecto de este inhibidor de serina proteasa en células de *Saccharomyces cerevisiae* con estrés causado por peróxido de hidrógeno. Los resultados mostraron niveles de marcadores de estrés oxidativo reducidos en estas células, mostrando la capacidad y potencial antioxidante de estos inhibidores ¹⁸⁴. En este sentido, se podría pensar que

algunos de los compuestos inhibidores de la serina proteasa NS3/4A del VHC, obtenidos de extractos de *Agaricus bisporus*, también pueden actuar como antioxidantes y, posiblemente, puedan ser responsables del efecto antifibrótico mostrado en células LX2 y en ratones KO LDLr con daño hepático por dieta alta en grasa, todo ello regulado a través de la vía inflamatoria.

Por ello, y a modo de conclusión, los extractos concentrados AbAEE se proponen como un alimento funcional y alternativa natural, no tóxica y económica en la prevención, por un lado, de la hepatitis C, al ser potentes inhibidores de la serina proteasa NS3/4A del VHC (genotipos 1b,2a,3a), y por el otro, frente a la fibrosis hepática enmarcada dentro de la EHGNA, la cual también podría derivarse de una infección por VHC. Cabe destacar el importante papel que estos extractos podrían desempeñar en la inhibición de proteasas similares de otros virus, como el virus de la Fiebre Amarilla o West Nile y el virus del Dengue. En el caso del dengue, una enfermedad viral cuyos afectados siguen creciendo, sobre todo en Asia y en el Pacífico, el uso de posibles inhibidores sería crítico para su tratamiento, ya que no existen vacunas, al igual que en el caso de la Hepatitis C. Actualmente tampoco existen terapias antivirales efectivas, existiendo únicamente tratamientos de apoyo hasta la mejoría del paciente ¹⁸⁵. Un reciente estudio ha demostrado que varias especies de champiñones presentaron compuestos bioactivos con propiedades antivirales frente al virus del Dengue. En concreto, fueron fracciones acuosas de extractos de estos champiñones los que presentaron mayor capacidad inhibitoria, además de menor toxicidad, señalando a compuestos hidrofílicos como posibles inhibidores ¹⁸⁶. Estos datos guardan un semejanza con los resultados obtenidos para el virus de la hepatitis C, por lo que es muy posible que los compuestos bioactivos presentes en las variedades de champiñones inhibidores del virus del Dengue puedan ser compartidas con los presentes en *Agaricus bisporus*, pudiendo estar en los extractos AbAEE un novedoso tratamiento inhibitor frente a la proteasa de un virus que actualmente no cuenta con terapia que bloquee su replicación. Ante estas excelentes propiedades, añadimos el efecto que estos extractos han presentado reduciendo la esteatosis en ratones con daño

hepático por dieta alta en grasa, reduciendo los niveles de marcadores fibróticos y de estrés oxidativo, y reflejándose estos resultados en células LX2. La supresión del complejo NLPR3 inflammasoma en ratones viejos que desarrollan daños hepáticos similares a los generados por dieta grasa, vieron reducidos estos mismos marcadores, por lo cual se podría establecer una relación entre estos resultados y el mecanismo de acción de los extractos, ya que estarían actuando a través de la regulación de la inflamación.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1) En extractos acuosos de hongos comestibles *Agaricus bisporus* (*AbAEE*) existen compuestos inhibidores de la serina-proteasa NS3/4A del VHC de diferentes genotipos (genotipo 1b, 2a, 3a).
- 2) Estos compuestos inhibidores tienen un peso molecular inferior a 3 kDa y presentan carácter hidrofílico.
- 3) Los niveles de replicación y ARN viral son menores tras el tratamiento con extractos *AbAEE*.
- 4) Del análisis por LC-MS/MS, realizado en colaboración con la Prof. Dra. María Dolores Luque de Castro, se han identificado compuestos de peso molecular inferior a 3 kDa y con carácter polar como posibles candidatos de la capacidad inhibitoria específica de la proteasa NS3/4A, entre los que destacan ergotioneina, adenina, guanina, hipoxantina y xantina, y más específicamente, ácido succínico, glucosamina, p-aminofenol y ornitina.
- 5) Los extractos acuosos *AbAEE* presentan compuestos bioactivos que modulan los niveles de expresión de genes y proteínas relacionadas con la fibrosis hepática enmarcada dentro de la EHGNA, con el estrés oxidativo e inflamación, tanto en células LX2 activadas como en un modelo animal KO LDLr con dieta alta en grasa.
- 6) La reducción de los niveles de expresión proteica de marcadores de metabolismo lipídico, estrés oxidativo y fibrosis hepática en ratones KO NLRP3 con daño hepático por envejecimiento, apoya la idea de que los extractos *AbAEE* modulen la fibrosis enmarcada dentro de la EHGNA a través de la regulación del proceso inflamatorio.

- 7) Los extractos *AbaEE* no presentan toxicidad en células (LX2 y Huh7.5) ni en animales (ratas) y su producción tiene un bajo coste.

La fibrosis hepática deriva de un daño crónico al tejido hepático por diversos agentes, entre los que destacan la hepatitis C y la EHGNA. Ambas enfermedades están estrechamente relacionadas y pueden aparecer de manera simultánea en un individuo, ya que el VHC requiere del metabolismo lipídico para completar su ciclo de vida en la etapa de ensamblaje, y a su vez, son estas gotas lipídicas una de las características propias de la esteatosis hepática. En este sentido, los extractos *AbAEE* podrían ser útiles para el tratamiento de la hepatitis C crónica, así como de la fibrosis hepática derivada de dicha infección o de una esteatosis hepática o EHGNA, modulando el estado oxidativo e inflamatorio del hígado. De este modo se propone el uso de extractos *AbAEE* como alternativa no tóxica, natural y económica para la prevención y el tratamiento frente a la infección por VHC y fibrosis hepática.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Yang, K. C. *et al.* Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Metabolic Syndrome Independently of Central Obesity and Insulin Resistance. *Sci. Rep.* **6**, 27034 (2016).
2. Bianchi, L. [Fibrosis of the liver]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **100**, 1214–5 (1970).
3. Prince, A. M. *et al.* Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet (London, England)* **2**, 241–6 (1974).
4. Choo, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–62 (1989).
5. Thomssen, R. *et al.* Association of hepatitis C virus in human sera with γ -lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* **181**, 293–300 (1992).
6. Pol, S. & Lagaye, S. The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes Immun.* **20**, 436–446 (2019).
7. Manns, M. P. *et al.* Hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17006 (2017).
8. Ferguson, D. *et al.* The lipid droplet-associated protein perilipin 3 facilitates hepatitis C virus-driven hepatic steatosis. *J. Lipid Res.* **58**, 420–432 (2017).
9. Dansako, H., Hiramoto, H., Ikeda, M., Wakita, T. & Kato, N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology* **462–463**, 166–174 (2014).
10. Chigbu, D. I., Loonawat, R., Sehgal, M., Patel, D. & Jain, P. Hepatitis C Virus

- Infection: Host–Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells* **8**, 376 (2019).
11. Freedman, H., Logan, M. R., Law, J. L. M. & Houghton, M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect. Dis.* **2**, 749–762 (2016).
 12. Lindenbach, B. D. *et al.* Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* (80-.). **309**, 623–626 (2005).
 13. Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J. & Bartenschlager, R. Morphological and Biochemical Characterization of the Membranous Hepatitis C Virus Replication Compartment. *J. Virol.* **87**, 10612–10627 (2013).
 14. Ribeiro, R. M. *et al.* Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. *PLoS Pathog.* **8**, e1002881 (2012).
 15. Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 159–216 (2012).
 16. McWilliam Leitch, E. C. & McLauchlan, J. Determining the cellular diversity of hepatitis C virus quasispecies by single-cell viral sequencing. *J. Virol.* **87**, 12648–55 (2013).
 17. Guan, M. *et al.* Three Different Functional Microdomains in the Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 (HVR1) Mediate Entry and Immune Evasion. *J. Biol. Chem.* **287**, 35631–35645 (2012).
 18. McCaffrey, K., Gouklani, H., Boo, I., Pountourios, P. & Drummer, H. E. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural

- role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J. Gen. Virol.* **92**, 112–121 (2011).
19. Echeverría, N., Moratorio, G., Cristina, J. & Moreno, P. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J. Hepatol.* **7**, 831 (2015).
 20. Smith, D. B. *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318–327 (2014).
 21. Ansaldi, F., Orsi, A., Sticchi, L., Bruzzone, B. & Icardi, G. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9633 (2014).
 22. Albecka, A. *et al.* Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **55**, 998–1007 (2012).
 23. Popescu, C.-I. *et al.* Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology (Basel)*. **3**, 892–921 (2014).
 24. Suzuki, T. in 199–209 (2017). doi:10.1007/978-981-10-4567-7_15
 25. Tabata, K., Neufeldt, C. J. & Bartenschlager, R. Hepatitis C Virus Replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* a037093 (2019). doi:10.1101/cshperspect.a037093
 26. Morozov, V. A. & Lagaye, S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J. Hepatol.* **10**, 186–212 (2018).
 27. Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5477–81 (1992).

28. Ikeda, M. *et al.* Analysis of the cell tropism of HCV by using in vitro HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes. *J. Hepatol.* **27**, 445–54 (1997).
29. Lohmann, V. *et al.* Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* (80-.). **285**, 110–113 (1999).
30. Pietschmann, T. *et al.* Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.* **76**, 4008–21 (2002).
31. Pietschmann, T. *et al.* Production of Infectious Genotype 1b Virus Particles in Cell Culture and Impairment by Replication Enhancing Mutations. *PLoS Pathog.* **5**, e1000475 (2009).
32. Kato, T. *et al.* Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* **64**, 334–9 (2001).
33. Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796 (2005).
34. Zhong, J. *et al.* Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9294–9299 (2005).
35. Pietschmann, T. *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7408–13 (2006).
36. Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. & Oh, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* **55**, 434–8 (1980).
37. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver

- Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **55**, 2005–2023 (2012).
38. Jennings, J., Faselis, C. & Yao, M. D. NAFLD-NASH: An Under-Recognized Epidemic. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **16**, 209–213 (2018).
 39. Nd, A. M. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, an Overview. *Integr. Med. (Encinitas)*. **18**, 42–49 (2019).
 40. Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* **65**, 1038–1048 (2016).
 41. Takakura, K. *et al.* Recent Insights Into the Multiple Pathways Driving Non-alcoholic Steatohepatitis-Derived Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **9**, 762 (2019).
 42. Brunt, E. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15080 (2015).
 43. Song, M. J. & Malhi, H. The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. *Pharmacol. Ther.* 107401 (2019). doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107401
 44. Hassan, K., Bhalla, V., El Regal, M. E. & A-Kader, H. H. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12082–101 (2014).
 45. Dorn, C. *et al.* Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 505–14 (2010).
 46. Angeles, T. S. & Hudkins, R. L. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert Opin. Drug*

- Discov.* **11**, 1187–1199 (2016).
47. Pereira, I. V., Stefano, J. T. & Oliveira, C. P. Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 245–251 (2011).
 48. Villanueva, C. J. *et al.* Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology* **50**, 434–442 (2009).
 49. Spahis, S., Delvin, E., Borys, J.-M. & Levy, E. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 519–541 (2017).
 50. Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Bonnet, F. & Fromenty, B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **58**, 1497–1507 (2013).
 51. Diehl, A. M., Li, Z. P., Lin, H. Z. & Yang, S. Q. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **54**, 303–6 (2005).
 52. Haghgoo, S. M., Sharafi, H. & Alavian, S. M. Serum cytokines, adipokines and ferritin for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. *Clin. Chem. Lab. Med.* **57**, 577–610 (2019).
 53. Walenbergh, S. M. A., Koek, G. H., Bieghs, V. & Shiri-Sverdlov, R. Non-alcoholic steatohepatitis: The role of oxidized low-density lipoproteins. *J. Hepatol.* **58**, 801–810 (2013).
 54. Houben, T., Brandsma, E., Walenbergh, S. M. A., Hofker, M. H. & Shiri-Sverdlov, R. Oxidized LDL at the crossroads of immunity in non-alcoholic steatohepatitis.

Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids **1862**, 416–429 (2017).

55. Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A. M. & Feldstein, A. E. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 1294–1303 (2016).
56. Li, J., Zhao, Y.-R. & Tian, Z. Roles of hepatic stellate cells in acute liver failure: From the perspective of inflammation and fibrosis. *World J. Hepatol.* **11**, 412–420 (2019).
57. Iwakiri, Y. & Kim, M. Y. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 524–36 (2015).
58. Stojšavljević, S., Gomerčić Palčić, M., Virović Jukić, L., Smirčić Duvnjak, L. & Duvnjak, M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 18070–91 (2014).
59. Koyama, Y. & Brenner, D. A. Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 55–64 (2017).
60. Nagao, K. *et al.* Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) alleviates nonalcoholic fatty liver disease through the suppression of monocyte chemoattractant protein 1 production in db/db mice. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 418–423 (2010).
61. Stanton, M. C. *et al.* Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *J. Inflamm.* **8**, 8 (2011).
62. Wouters, K. *et al.* Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **48**, 474–486 (2008).

63. Ix, J. H. & Sharma, K. Mechanisms Linking Obesity, Chronic Kidney Disease, and Fatty Liver Disease: The Roles of Fetuin-A, Adiponectin, and AMPK. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 406–412 (2010).
64. Wree, A. *et al.* NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J. Mol. Med.* **92**, 1069–1082 (2014).
65. Doyle, S., Ozaki, E. & Campbell, M. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J. Inflamm. Res.* **8**, 15 (2015).
66. Wan, X., Xu, C., Yu, C. & Li, Y. Role of NLRP3 Inflammasome in the Progression of NAFLD to NASH. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, 1–7 (2016).
67. Kupffer, C. Ueber Sternzellen der Leber. *Arch. für Mikroskopische Anat.* **12**, 353–358 (1876).
68. Higashi, T., Friedman, S. L. & Hoshida, Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **121**, 27–42 (2017).
69. Seki, E. & Schwabe, R. F. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology* **61**, 1066–1079 (2015).
70. Delgado Coello, B. A. & Mas Oliva, J. Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática. (2017).
71. Roderfeld, M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biol.* **68–69**, 452–462 (2018).
72. Rockey, D. C., Du, Q. & Shi, Z. Smooth Muscle α -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Am. J. Pathol.* **189**, 2209–2220 (2019).

73. Otogawa, K., Ogawa, T., Shiga, R., Ikeda, K. & Kawada, N. Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. *Hepatol. Int.* **3**, 378–383 (2009).
74. Delgado, I. *et al.* GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice. *Hepatology* **59**, 2358–2370 (2014).
75. Sandmann, L., Schulte, B., Manns, M. P. & Maasoumy, B. Treatment of Chronic Hepatitis C: Efficacy, Side Effects and Complications. *Visc. Med.* **35**, 161–170 (2019).
76. *Sofosbuvir. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).
77. *Hepatitis C (HCV) Agents. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (2012).
78. Pawlotsky, J.-M. *et al.* EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* **69**, 461–511 (2018).
79. Liu, Z. *et al.* World-wide Prevalence of Substitutions in HCV Genome Associated With Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2019). doi:10.1016/j.cgh.2019.10.046
80. Altamirano-Barrera, A., Barranco-Fragoso, B. & Méndez-Sánchez, N. Management Strategies for Liver Fibrosis. *Ann. Hepatol.* **16**, 48–56 (2017).
81. Trautwein, C., Friedman, S. L., Schuppan, D. & Pinzani, M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J. Hepatol.* **62**, S15–S24 (2015).
82. Hagens, W. I. *et al.* Cellular Targeting of the Apoptosis-Inducing Compound Gliotoxin to Fibrotic Rat Livers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 902–910 (2008).

83. Kisseleva, T. *et al.* Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9448–9453 (2012).
84. Poilil Surendran, S., George Thomas, R., Moon, M.-J. & Jeong, Y. Y. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 12**, 6997–7006 (2017).
85. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Insulin Resistance, and Ceramides. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1866–1869 (2019).
86. Pennisi, G. *et al.* Pharmacological Therapy of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What Drugs Are Available Now and Future Perspectives. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**, 4334 (2019).
87. Perumpail, B. *et al.* The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD. *Diseases* **6**, 86 (2018).
88. Wong, V. W.-S. & Singal, A. K. Emerging medical therapies for non-alcoholic fatty liver disease and for alcoholic hepatitis. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 53–53 (2019).
89. Tølbøl, K. S. *et al.* Metabolic and hepatic effects of liraglutide, obeticholic acid and elafibranor in diet-induced obese mouse models of biopsy-confirmed nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **24**, 179–194 (2018).
90. Ratzl, V. *et al.* Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator–Activated Receptor– α and – δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **150**, 1147–1159.e5 (2016).
91. Safadi, R. *et al.* The Fatty Acid–Bile Acid Conjugate Aramchol Reduces Liver Fat Content in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol.*

- Hepatol.* **12**, 2085–2091.e1 (2014).
92. Kim, D. *et al.* Subclinical Hypothyroidism and Low-Normal Thyroid Function Are Associated With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 123–131.e1 (2018).
93. Harrison, S. *et al.* MGL-3196, a selective thyroid hormone receptor-beta agonist significantly decreases hepatic fat in NASH patients at 12 weeks, the primary endpoint in a 36 week serial liver biopsy study. *J. Hepatol.* **68**, S38 (2018).
94. Barreyro, F. J. *et al.* The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **35**, 953–966 (2015).
95. Rojas, Á. *et al.* Effect of Quercetin on Hepatitis C Virus Life Cycle: From Viral to Host Targets. *Sci. Rep.* **6**, 31777 (2016).
96. Rehman, S., Ashfaq, U. A., Ijaz, B., Jabeen, Z. & Riazuddin, S. Comparison of Anti-HCV Activity of Multiple Punica granatum Extracts and Fractions in Virus-infected Human Hepatocytes. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **19**, 1221–1231 (2019).
97. Furuta, A. *et al.* Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs* **12**, 462–76 (2014).
98. Cremades, O. *et al.* White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Biosci.* **10**, 42–47 (2015).
99. Mleczek, M. *et al.* Elemental characteristics of mushroom species cultivated in China and Poland. *J. Food Compos. Anal.* **66**, 168–178 (2018).

100. Mallard, B., Leach, D. N., Wohlmuth, H. & Tiralongo, J. Synergistic immunomodulatory activity in human macrophages of a medicinal mushroom formulation consisting of Reishi, Shiitake and Maitake. *PLoS One* **14**, e0224740 (2019).
101. Vetvicka, V. *et al.* Immunomodulating Effects Exerted by Glucans Extracted from the King Oyster Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes) Grown in Substrates Containing Various Concentrations of Olive Mill Waste. *Int. J. Med. Mushrooms* **21**, 765–781 (2019).
102. Vetter, J. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chem.* **102**, 6–9 (2007).
103. Nasiri, F., Ghiassi Tarzi, B., Bassiri, A. R., Hoseini, S. E. & Aminafshar, M. *Comparative Study on the Main Chemical Composition of Button Mushroom's (Agaricus bisporus) Cap and Stipe. Journal of Food Biosciences and Technology* **3**, (2013).
104. Ramos, M. *et al.* *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. *Food Chem.* **292**, 176–187 (2019).
105. de Freitas, C. S. *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007072 (2019).
106. Gan, C. S., Lim, S. K., Chee, C. F., Yusof, R. & Heh, C. H. Sofosbuvir as treatment against dengue? *Chem. Biol. Drug Des.* **91**, 448–455 (2018).
107. Pathak, N. *et al.* Pharmacophore anchor models of flaviviral NS3 proteases lead to drug repurposing for DENV infection. *BMC Bioinformatics* **18**, 548 (2017).
108. Liang, C.-H. *et al.* Antioxidant properties of fruiting bodies, mycelia, and fermented products of the culinary-medicinal king oyster mushroom, *Pleurotus*

- eryngii (higher Basidiomycetes), with high ergothioneine content. *Int. J. Med. Mushrooms* **15**, 267–75 (2013).
109. Anselmi, K. *et al.* Gliotoxin causes apoptosis and necrosis of rat Kupffer cells in vitro and in vivo in the absence of oxidative stress: exacerbation by caspase and serine protease inhibition. *J. Hepatol.* **47**, 103–13 (2007).
 110. Nair, D. G., Weiskirchen, R. & Al-Musharafi, S. K. The use of marine-derived bioactive compounds as potential hepatoprotective agents. *Acta Pharmacol. Sin.* **36**, 158–170 (2015).
 111. Xin, X., Chen, C., Hu, Y.-Y. & Feng, Q. Protective effect of genistein on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Biomed. Pharmacother.* **117**, 109047 (2019).
 112. Yang, H. *et al.* Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in *db / db* mice. *Phyther. Res.* ptr.6486 (2019). doi:10.1002/ptr.6486
 113. Porras, D. *et al.* Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. *Free Radic. Biol. Med.* **102**, 188–202 (2017).
 114. Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M. F. & Ferreira, I. C. F. R. Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends Food Sci. Technol.* **50**, 193–210 (2016).
 115. Jeong, S. C. *et al.* White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*

- 30**, 49–56 (2010).
116. Rojas, Á. *et al.* Natural extracts abolished lipid accumulation in cells harbouring non-favourable PNPLA3 genotype. *Ann. Hepatol.* **17**, 242–249 (2018).
 117. Inoue, N., Inafuku, M., Shirouchi, B., Nagao, K. & Yanagita, T. Effect of Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) on the pathogenesis of lipid abnormalities in obese, diabetic ob/ob mice. *Lipids Health Dis.* **12**, 18 (2013).
 118. Itoh, A. *et al.* Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 983–987 (2010).
 119. Akamatsu, S. *et al.* Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1957–60 (2004).
 120. Nisar, J. *et al.* Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes): A Species with Antioxidant, Immunomodulatory, and Hepatoprotective Activities in Hypercholesterolemic Rats. *Int. J. Med. Mushrooms* **19**, 981–990 (2017).
 121. Fernandes, Â. *et al.* Gamma and electron-beam irradiation as viable technologies for wild mushrooms conservation: effects on macro- and micro-elements. *Eur. Food Res. Technol.* **242**, 1169–1175 (2016).
 122. Stojković, D. *et al.* Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product – natural preservatives in yoghurt. *Food Funct.* **5**, 1602 (2014).
 123. Yildiz, O., Can, Z., Laghari, A. Q., Şahin, H. & Malkoç, M. Wild Edible

- Mushrooms as a Natural Source of Phenolics and Antioxidants. *J. Food Biochem.* **39**, 148–154 (2015).
124. Rathore, H., Prasad, S. & Sharma, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* **5**, 35–46 (2017).
 125. Cremades, O. *et al.* Preparation and characterisation of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Chem.* **133**, 1538–1543 (2012).
 126. Delgado-Povedano, M. del M., Sánchez de Medina, V., Bautista, J., Priego-Capote, F. & Luque de Castro, M. D. Tentative identification of the composition of *Agaricus bisporus* aqueous enzymatic extracts with antiviral activity against HCV: A study by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high resolution mode. *J. Funct. Foods* **24**, 403–419 (2016).
 127. Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858–63 (1982).
 128. Xu, L. *et al.* Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* **54**, 142–151 (2005).
 129. Carrière, M. *et al.* A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J. Med. Virol.* **79**, 155–60 (2007).
 130. Colella, A. D. *et al.* Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal. Biochem.* **430**, 108–110 (2012).
 131. Rossi, C. *et al.* Hepatitis C virus reinfection after successful treatment with direct-acting antiviral therapy in a large population-based cohort. *J. Hepatol.* **69**, 1007–

- 1014 (2018).
132. Dore, G. J. HCV reinfection as a positive indication of high-risk population treatment access. *J. Viral Hepat.* **26**, 516–518 (2019).
 133. Valencia, J. *et al.* High rates of early HCV reinfection after DAA treatment in people with recent drug use attended at mobile harm reduction units. *Int. J. Drug Policy* **72**, 181–188 (2019).
 134. Guo, X., Zhong, J.-Y. & Li, J.-W. Hepatitis C Virus Infection and Vaccine Development. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **8**, 195–204 (2018).
 135. Sahuc, M.-E. *et al.* Dehydrojuncusol, a Natural Phenanthrene Compound Extracted from *Juncus maritimus* , Is a New Inhibitor of Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* **93**, (2019).
 136. Matsuhisa, K. *et al.* Anti-HCV effect of Lentinula edodes mycelia solid culture extracts and low-molecular-weight lignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **462**, 52–57 (2015).
 137. Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A. & Pizzoferrato, L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chem.* **84**, 201–206 (2004).
 138. Manzi, P. & Pizzoferrato, L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* **68**, 315–318 (2000).
 139. Liu, Y. *et al.* Immunomodulatory Activities of Polysaccharides from White Button Mushroom, *Agaricus bisporus* (Agaricomycetes), Fruiting Bodies and Cultured Mycelia in Healthy and Immunosuppressed Mice. *Int. J. Med. Mushrooms* **21**, 13–27 (2019).
 140. Lin, C. *HCV NS3-4A Serine Protease. Hepatitis C Viruses: Genomes and*

Molecular Biology (Horizon Bioscience, 2006).

141. de Wispelaere, M. *et al.* Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations. *Nat. Commun.* **10**, 3468 (2019).
142. Acero Fernández, D. *et al.* Changes in the epidemiology and distribution of the hepatitis C virus genotypes in North-Eastern Spain over the last 35 years. *Gastroenterol. Hepatol.* **41**, 2–11 (2018).
143. Kalaras, M. D., Richie, J. P., Calcagnotto, A. & Beelman, R. B. Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food Chem.* **233**, 429–433 (2017).
144. Weigand-Heller, A. J., Kris-Etherton, P. M. & Beelman, R. B. The bioavailability of ergothioneine from mushrooms (*Agaricus bisporus*) and the acute effects on antioxidant capacity and biomarkers of inflammation. *Prev. Med. (Baltim.)* **54**, S75–S78 (2012).
145. Phuong, D. T., Ma, C.-M., Hattori, M. & Jin, J. S. Inhibitory effects of antrodins A-E from *Antrodia cinnamomea* and their metabolites on hepatitis C virus protease. *Phytother. Res.* **23**, 582–4 (2009).
146. Morrison, M. C. *et al.* Intervention with a caspase-1 inhibitor reduces obesity-associated hyperinsulinemia, non-alcoholic steatohepatitis and hepatic fibrosis in LDLR^{-/-}.Leiden mice. *Int. J. Obes.* **40**, 1416–1423 (2016).
147. Kanaya, N. *et al.* Protective Effects of White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) against Hepatic Steatosis in Ovariectomized Mice as a Model of Postmenopausal Women. *PLoS One* **6**, e26654 (2011).
148. Tsuchida, T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation as a therapeutic target

- for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Folia Pharmacol. Jpn.* **154**, 203–209 (2019).
149. Caja, L. *et al.* TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1294 (2018).
 150. Fabregat, I. & Caballero-Díaz, D. Transforming Growth Factor- β -Induced Cell Plasticity in Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Front. Oncol.* **8**, 357 (2018).
 151. Geng, Y. *et al.* Screening and Isolation for Anti-hepatofibrotic Components from Medicinal Mushrooms using TGF-(β 1-induced) Live Fibrosis in Hepatic Stellate Cells. *Int. J. Med. Mushrooms* **16**, 529–539 (2014).
 152. Geethangili, M. & Tzeng, Y.-M. Review of Pharmacological Effects of *Antrodia camphorata* and Its Bioactive Compounds. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2011**, 212641 (2011).
 153. Chirumbolo, S. Hormesis, resveratrol and plant-derived polyphenols: some comments. *Hum. Exp. Toxicol.* **30**, 2027–2030 (2011).
 154. Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J. & Merkus, D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–15 (2013).
 155. Kozarski, M. *et al.* Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules* **20**, 19489–19525 (2015).
 156. Paul, B. D. & Snyder, S. H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ.* **17**, 1134–1140 (2010).
 157. Halliwell, B., Cheah, I. K. & Tang, R. M. Y. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBS Lett.* **592**, 3357–3366 (2018).

158. Pahila, J., Ishikawa, Y. & Ohshima, T. Effects of Ergothioneine-Rich Mushroom Extract on the Oxidative Stability of Astaxanthin in Liposomes. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 3491–3501 (2019).
159. Luque-Sierra, A., Alvarez-Amor, L., Kleemann, R., Martín, F. & Varela, L. M. Extra-Virgin Olive Oil with Natural Phenolic Content Exerts an Anti-Inflammatory Effect in Adipose Tissue and Attenuates the Severity of Atherosclerotic Lesions in *Ldlr* $-/-$.Leiden Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, 1800295 (2018).
160. Gonçalves, N. B. *et al.* α -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Clinics (Sao Paulo)*. **73**, e150 (2018).
161. Iñiguez, M. *et al.* Agaricus bisporus supplementation reduces high-fat diet-induced body weight gain and fatty liver development. *J. Physiol. Biochem.* **74**, 635–646 (2018).
162. Shimizu, T., Mori, K., Ouchi, K., Kushida, M. & Tsuduki, T. Effects of Dietary Intake of Japanese Mushrooms on Visceral Fat Accumulation and Gut Microbiota in Mice. *Nutrients* **10**, 610 (2018).
163. Gnoni, G. V., Paglialonga, G. & Siculella, L. Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 761–768 (2009).
164. Liu, Y., Zheng, D., Su, L., Wang, Q. & Li, Y. Protective effect of polysaccharide from Agaricus bisporus in Tibet area of China against tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* (2018). doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2018.06.179
165. Miyazawa, N., Yoshimoto, H., Kurihara, S., Hamaya, T. & Eguchi, F.

- Improvement of Diet-induced Obesity by Ingestion of Mushroom Chitosan Prepared from *Flammulina velutipes*. *J. Oleo Sci.* **67**, 245–254 (2018).
166. Inafuku, M. *et al.* Protective effects of fractional extracts from *Panellus serotinus* on non-alcoholic fatty liver disease in obese, diabetic db/db mice. *Br. J. Nutr.* **107**, 639–646 (2012).
 167. Li, S. *et al.* The Antioxidative, Antiaging, and Hepatoprotective Effects of Alkali-Extractable Polysaccharides by *Agaricus bisporus*. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2017**, 1–12 (2017).
 168. Ghahremani-Majd, H. & Dashti, F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Hortic. Environ. Biotechnol.* **56**, 376–382 (2015).
 169. Al-Dbass, A. M., Al- Daihan, S. K. & Bhat, R. S. *Agaricus blazei* Murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **19**, 303–309 (2012).
 170. Solano-Aguilar, G. *et al.* The Effect of Dietary Mushroom *Agaricus bisporus* on Intestinal Microbiota Composition and Host Immunological Function. *Nutrients* **10**, 1721 (2018).
 171. Yang, J. *et al.* Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients* **11**, 872 (2019).
 172. Schild, M. H. & Guy, C. D. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Surg. Pathol. Clin.* **11**, 267–285 (2018).
 173. Rhee, E.-J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Diabetes: An Epidemiological

- Perspective. *Endocrinol. Metab.* **34**, 226 (2019).
174. Liu, B., Mao, X., Huang, D., Li, F. & Dong, N. Novel role of NLRP3-inflammasome in regulation of lipogenesis in fasting-induced hepatic steatosis. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **12**, 801–811 (2019).
 175. Maher, J. J., Leon, P. & Ryan, J. C. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **48**, 670–8 (2008).
 176. Del Campo, J. A., Gallego, P., Grande, L. & to, C. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. (2018).
 177. Hussain, M. M., Rava, P., Walsh, M., Rana, M. & Iqbal, J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr. Metab. (Lond)*. **9**, 14 (2012).
 178. Luo, D. *et al.* Study on Metabolic Trajectory of Liver Aging and the Effect of Fufang Zhenzhu Tiaozhi on Aging Mice. *Front. Pharmacol.* **10**, 926 (2019).
 179. Streeper, R. S. *et al.* Deficiency of the lipid synthesis enzyme, DGAT1, extends longevity in mice. *Aging (Albany. NY)*. **4**, 13–27 (2012).
 180. Cheng, Y. *et al.* Aging-associated oxidative stress inhibits liver progenitor cell activation in mice. *Aging (Albany. NY)*. **9**, 1359–1374 (2017).
 181. Maeso-Díaz, R. *et al.* Aging Influences Hepatic Microvascular Biology and Liver Fibrosis in Advanced Chronic Liver Disease. *Aging Dis.* **10**, 684 (2019).
 182. Negash, A. A. *et al.* IL-1 β Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. *PLoS Pathog.* **9**, e1003330 (2013).
 183. Wu, X., Dong, L., Lin, X. & Li, J. Relevance of the NLRP3 Inflammasome in the

- Pathogenesis of Chronic Liver Disease. *Front. Immunol.* **8**, 1728 (2017).
184. Vishvakarma, R. & Mishra, A. Protective effect of a protease inhibitor from *Agaricus bisporus* on *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **49**, 244–254 (2019).
185. Schwartz, L. M., Halloran, M. E., Durbin, A. P. & Longini, I. M. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* **33**, 3293–3298 (2015).
186. Ellan, K. *et al.* Anti-viral activity of culinary and medicinal mushroom extracts against dengue virus serotype 2: an in-vitro study. *BMC Complement. Altern. Med.* **19**, 260 (2019).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1. **Paloma Gallego Yerga**; Ángela Rojas; Gonzalo Falcón García; Pilar Carbonero Aguilar; María R García Lozano; Antonio Gil; Lourdes Grande; Olga Cremades; Manuel Romero Gómez; Juan D Bautista Palomas; José Antonio Del Campo Castillo. Water-soluble extracts from edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) as inhibitors of the hepatitis C viral replication. *Functional Foods*. 2019.
2. José Antonio Del Campo Castillo; Rocío Gallego Durán; **Paloma Gallego Yerga**; Lourdes Grande Santamaría. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
3. María Ángeles Rodríguez Hernández; Raúl González; A J de la Rosa; ; **Paloma Gallego Yerga**; R Ordóñez; Elena Navarro Villarán; Laura Contreras; M Rodríguez Arribas; J González Gallego; J.M. Álamo Martínez; L.M.M Gómez; José Antonio Del Campo Castillo; J.L. Quiles; J.M. Fuentes; Jesús de la Cruz; J.L. Mauriz; F.J. Padillo; Jordi Muntané. Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by sorafenib in liver cancer cells. *Journal of Cell Physiology*. 2018.
4. Pilar Carbonero Aguilar; Gonzalo Falcón García; **Paloma Gallego Yerga**; José Antonio Del Campo Castillo; Isabel Moreno; Juan D Bautista Palomas. Preliminary Studies of the Toxicity of *Agaricus Bisporus* Aqueous Enzymatic Extracts (AbAEE). *Journal of Toxins*. 2018.
5. José Antonio Del Campo Castillo; **Paloma Gallego Yerga**; Lourdes Grande Santamaría. Role of inflammatory response in liver diseases. *World Journal of Hepatology*. 2018.
6. José Antonio Del Campo Castillo; Marta García Valdecasas; Antonio Gil Gómez; Ángela Rojas; **Paloma Gallego Yerga**; Javier Ampuero; Rocío Gallego Durán; Helena Pastor; Lourdes Grande Santamaría; F.J. Padillo; Jordi Muntané; Manuel Romero Gómez. Simvastatin and metformin inhibit cell growth in hepatitis C virus infected cells via mTOR increasing PTEN and autophagy. *PloS One*. 2018.

7. Ángela Rojas; **Paloma Gallego Yerga**; Antonio Gil Gómez; Rocío Muñoz Hernández; Lourdes Rojas; Rosario Maldonado; Rocío Gallego Durán; Marta García Valdecasas; José Antonio Del Campo Castillo; Juan D Bautista Palomas; Manuel Romero Gómez. Natural Extracts Abolished Lipid Accumulation in Cells Harboring non-favourable PNPLA3 genotype. *Annals of Hepatology*. 2017.

APORTACIONES A CONGRESOS

9. APORTACIONES A CONGRESOS

❖ XXXVII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química

Lugar celebración: San Sebastián (España) **Fecha:** 26-30 de mayo de 2019

Autores: M-R. García Lozano, P.Gallego, M.Vega-Holm, F.Iglesias-Guerra, J.A del Campo, J.M. Vega-Pérez.

Título: Diseño, síntesis y evaluación biológica de derivados de piperazinas 2-sustituidas como inhibidores de la proteasa NS3/4A de la Hepatitis C.

Tipo de participación: Participación con comunicación oral.

❖ 44ª Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Lugar celebración: Madrid (España) **Fecha:** 20-22 de febrero de 2019

Autores: Paloma Gallego Yerga, Amparo Luque Sierra, Lourdes Grande, Juan D Bautista, Francisco Martín-Bermudo, M Dolores Quintana-Artacho, José A del Campo.

Título: Disminución de la fibrosis hepática y el estrés oxidativo mediante extractos de champiñones en células LX2 y en un modelo animal con dieta rica en grasa.

Tipo de participación: Asistencia y participación con póster.

❖ III Congreso Nacional de Jóvenes Químicos y Bioquímicos terapéuticos “QuimBioQuim”

Lugar celebración: Albacete (España) **Fecha:** 3-5 de octubre de 2018

Autores: Paloma Gallego Yerga, Amparo Luque Sierra, Juan D Bautista, Francisco Martín-Bermudo, José A del Campo.

Título: Treatment with mushroom extracts decreases hepatic fibrosis and oxidative stress in LX2 cells and in a mouse model of NALFD.

Tipo de participación: Asistencia y participación con comunicación oral (Flash) y póster.

❖ **43ª Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado**

Lugar celebración: Madrid (España)

Fecha: 21-23 de febrero de 2018

Autores: María Ángeles Rodríguez-Hernández, Raúl González, Ángel José De la Rosa, Paloma Gallego, Laura Contreras, Raquel Ordoñez, Elena Navarro-Villarán, Mario Rodríguez-Arribas, Javier González-Gallego, José María Álamo-Martínez, Luís Miguel Marín-Gómez, José Antonio Del Campo, José Luís Quiles, José Manuel Fuentes, Jesús De la Cruz, José Luís Mauriz, Francisco Javier Padillo, Jordi Muntané.

Título: Caracterización molecular de los mecanismos de muerte celular inducidos por sorafenib en hepatocarcinoma: Estudios *in vitro* e *in vivo*.

Tipo de participación: Asistencia y participación con discusión de póster.

❖ **The 1st International Conference on Fatty Liver**

Lugar celebración: Sevilla (España)

Fecha: 1-3 de junio de 2017

Autores: Gallego-Yerga P, Rodríguez-Hernández A, Navarro-Villarán E, Grande L, Padillo FJ, Del Campo JA, Muntané J.

Título: AMPk activation exerts a protective role during lipotoxicity in primary culture of human hepatocytes

Tipo de participación: Asistencia y participación con discusión de póster.

❖ 42º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Lugar de celebración: Madrid (España)

Fecha: 15-17 de febrero de 2017

Autores: Paloma Gallego, Gonzalo Falcón, Pilar Carbonero, Lourdes Grande, Manuel Romero-Gómez, Juan D. Bautista, José A. del Campo.

Título: Extractos solubles de hongos presentan un efecto hepatoprotector y anti-fibrótico en líneas celulares de hepatoma humano (Huh-7.5) y células estrelladas hepáticas humanas (LX2).

Tipo de participación: Participación con póster

❖ 41º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Lugar de celebración: Madrid (España)

Fecha: 17-19 de febrero de 2015

Autores: José Antonio del Campo, A. Rojas, P. Gallego, P. Carbonero, J.D. Bautista y M. Romero-Gómez.

Título: Extractos solubles del champiñón (*Agaricus bisporus*) inhiben la actividad proteasa de la proteína NS3 y la replicación del virus de la hepatitis C.

Tipo de participación: Participación con póster

❖ 41º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

Lugar de celebración: Madrid (España)

Fecha: 17-19 de febrero de 2015

Autores: A. Rojas, R. Maldonado, P. Gallego, J. Bautista, J.A del Campo y M. Romero-Gómez.

Título: Extractos naturales impiden la acumulación lipídica en un modelo *in vitro* de EHGNA con genotipo desfavorable GG de PNPLA3.

Tipo de participación: Participación con póster.

❖ **IV Jornada de Seguridad Alimentaria**

Lugar de celebración: Sevilla (España)

Fecha: 21 de noviembre de 2014

Autores: Paloma Gallego Yerga y Ezequiel González Miranda.

Título: Grayanotoxinas: responsables de la intoxicación por miel loca.

Tipo de participación: Participación con póster y asistencia.

❖ **International congress on Water, Waste and Energy Management**

Lugar de celebración: Oporto (Portugal)

Fecha: 16-18 de julio de 2014

Autores: B. Rodríguez-Morgado, P. Caballero, R. Jiménez, P. Gallego, M.A. Pérez, M. Tejada, A. Aragón, A. García- Martínez, J.J Salas, J. Parrado.

Título: A novel valorisation process of sewage sludge. Enzyme production by *Bacillus licheniformis*.


Tipo de participación: Participación con póster.

ANEXOS (ARTÍCULOS)



Cite this: DOI: 10.1039/c9fo00733d

Water-soluble extracts from edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) as inhibitors of hepatitis C viral replication†

Paloma Gallego,^a Ángela Rojas,^b Gonzalo Falcón,^c Pilar Carbonero,^c María R. García-Lozano,^a Antonio Gil,^b Lourdes Grande,^a Olga Cremades,^d Manuel Romero-Gómez,^b Juan D. Bautista*^c and José A. del Campo ^{*a}

Hepatitis C virus (HCV) is the main agent responsible for chronic liver disease. Recent advances in anti-HCV treatment strategies have significantly increased the viral clearance rate (>90%). However, sustained antiviral responses vary in different cohorts, and high costs limit the broad use of direct-acting antivirals (DAAs). The goal of this study is to evaluate the inhibitory ability of well characterized (LC-QTOF-MS/MS) aqueous extracts obtained from edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) to diminish HCV viral replication. Our data have demonstrated an *in vitro* inhibitory effect of *A. bisporus* extracts on NS3/4A protease and HCV replication. Fractionation by ultra-filtration and sequential liquid–liquid extraction showed that the compounds responsible for the inhibition are water-soluble with low molecular weights (<3 kDa) and that action could be through the following five compounds: ergothioneine, adenine, guanine, hypoxanthine, and xanthine, which are present in all fractions (UF-3, AqF-3 kDa and organic fractions) showing NS3/4A inhibition. Low molecular weight aqueous extracts (<3 kDa) from *A. bisporus* have potential applications in the prophylaxis and treatment of HCV, especially for patients who do not have access to the last generation of DAAs. They may be useful as well for other flaviviruses, which also possess a NS3 serine protease.

Received 9th April 2019,
Accepted 30th May 2019
DOI: 10.1039/c9fo00733d
rsc.li/food-function

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the major health-care problems in the world. It was described in 1989 by the group of Choo using genome cloning methods.¹ HCV is a small, enveloped, single-stranded and positive-sense RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family. It was found in serum associated with low-density lipoproteins (LDL) and very-low density lipoproteins (VLDL) as a lipoviroparticle.²

There are seven major genotypes of HCV, which are known as genotypes one to seven. The genotypes are divided into several subtypes with the number of subtypes depending on the genotype (1a, 1b, 3a, *etc.*).^{3,4}

The virus structure has several important proteins for its replication cycle, which are processed into the endoplasmic reticulum (ER). The viral genome is translated into a polypeptide, which is sequentially processed into mature proteins. The structural protein core and the envelope proteins (E1 and E2) lie at the N-terminus of the polyprotein. The non-structural proteins NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B are located at the C-terminus. The core protein associates with the viral RNA to form a nucleocapsid. E1 and E2 proteins form a heterodimer, which is the functional unit of the viral envelope. NS2 is a multifunctional protein essential for both assembly and replication owing to its function as an autocatalytic cysteine protease.⁵ The N-terminal domain of NS3 is the second viral protease that processes the viral polypeptide towards the C-terminus, whereas the C-terminal domain of NS3 has a helicase function. NS4A is a small hydrophobic protein that serves as a cofactor for NS3 serine protease. NS4B and NS5A are proteins involved in replication and assembly. NS5B is the viral RNA-dependent RNA polymerase that forms a replication complex together with NS3, NS4A, NS4B and NS5A.⁶

The progression of this hepatic disease depends on several viral factors, such as the virus genotype, quasispecies, viral load and polymorphism.⁷ It also depends on intrinsic factors,

^aUnit for Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERehd, Valme University Hospital, Seville, Spain. E-mail: jantonio.delcampo@ciberehd.org; Tel: +34 955015485

^bDepartment of Digestive Disease, Biomedicine Institute of Seville (IBiS) and CIBERehd, Virgen del Rocío–Virgen Macarena University Hospitals, Seville, Spain

^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain. E-mail: jdbaut@us.es; Tel: +34 954556854

^dEscuela Universitaria de Osuna, 41640-Osuna, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9fo00733d

and all these contribute to the development of the disease and to the treatment efficacy.

The standard treatment for a long time has been the combination of pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV).⁸ However, the low sustained virologic response (SVR) obtained with these drugs leads to the search for new therapies against HCV. These new therapies were developed in 2011.⁹ The most important NS3/4A protease inhibitors were boceprevir (BPV) and telaprevir (TPV), both with a linear ketoamide alpha linear structure. Both TPV and BPV form a covalent bond with a serine-139 protease catalytic center.¹⁰ Actually, all these treatments have remained obsolete due to their adverse effects, low rates of SVR and the appearance of resistance.¹¹ Currently a novel inhibitor of the RNA NS5B polymerase called Sofosbuvir (Sovaldi®) represents the base of the new therapy. This drug transforms inside the hepatocytes into its active form, stopping the genome replication.¹² However, these treatments are too expensive, and many patients do not have access to these drugs. Thus, low cost alternative treatments are needed.

In recent years, there has been huge interest on natural inhibitors of HCV. For instance, quercetin modulates the activity of NS3 and NS5A viral proteins decreasing the HCV replication.^{13,14} Other studies have described protease NS3/4A natural inhibitors, such as ellagitannins from crude pomegranate extracts (*Punicagranatum*) of fruit peel. The pure compounds, punicalagin, punicalin and ellagic acid specifically blocked the HCV NS3/4A protease activity *in vitro*.¹⁵ Other NS3 protease inhibitors have been isolated from sea sponge, such as halisulphate-3 (hal3) and suvanine.¹⁶ Some of these natural inhibitors could be present in edible mushrooms such as *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*), *Agaricus blazei*, *Shiitake* or *Pleurotus*, since antiviral activity has been described for edible mushroom extracts (Patent P201531500).^{17–19}

HCV NS3/4A protease became a relevant target since this protein is involved in viral replication.^{20,21} The aims of the present study were: (i) to confirm the *in vitro* inhibition of the protease NS3/4A using *A. bisporus* aqueous enzymatic extracts (AbAEE) and fractions, and (ii) to analyze the role of AbAEE and its fractions on HCV replication *in vitro* and the mechanism involved.

2. Materials and methods

A. bisporus (J.E. Lange) Imbach specimens were cultivated in a greenhouse at the University of Seville (CITIUS). Details regarding the preparation of extracts are given below. Both mushrooms and aqueous extracts are available in our laboratory upon request. We used 3 different batches of *A. bisporus* to check the consistency of the experiments.

To evaluate the inhibitory activity of the HCV replication on mushroom extracts, we analyzed the inhibition of viral replication *in vitro* using JFH1 particles, recombinant proteins and immunoblot analyses from human hepatoma (Huh7.5) cell culture. As a result of routine screening of inhibitors and activators of enzymes with potential medico-pharmaceutical inter-

est, we detected the inhibitory activity of the HCV replication on crude *A. bisporus* extracts. In this study, we obtained different fractions of the crude edible mushroom by ultrafiltration and sequential liquid liquid-extraction (LLE), and we evaluated their ability to inhibit NS3/4A protease activity in a fluorometric assay. Additionally, we analyzed the expression of HCV proteins (anti- β cytoplasmic actin, anti-core and anti-NS3) from an Huh7-5 cell culture infected with HCV and treated with quercetin (50 μ M) and *A. bisporus* soluble extract (0.1 mg ml⁻¹), using immunoblot analysis. More detailed information on the design and setting of the study is given in the following sections of this article.

2.1. Reagents, antibodies and primers

All reagents, antibodies and primers used in this study are described in the ESI (Table 1S†). Quercetin was purchased from HWI ANALYTIK GmbH (Rülzheim, Germany) and the mushroom aqueous extracts, prepared as described below, were added to culture media when indicated.

2.2. Preparation of *Agaricus bisporus* aqueous enzymatic extracts (AbAEE)

White button mushrooms (*A. bisporus*) were used as the raw material. All chemicals used were of analytical grade. AbAEE were obtained by a previously described enzymatic procedure.²² Briefly, after *A. bisporus* homogenization (10 g + 10 ml distilled water) and enzymatic digestion with a mixture of glucanase and chitinase enzymes (Novo Nordisk®) at pH = 5, temperature 55 °C and an enzyme/substrate ratio of 0.01, for 24 hours, finally, the temperature was increased up to 90 °C for 120 min to inactivate the enzymes. After cooling to room temperature, the pH was adjusted to 7.0 with 1 M NaOH, and centrifuged at 8000g. The supernatant was collected and filtered through a 0.2 μ m membrane, using the filtrate as “crude AbAEE” for activity assays and fractionation.

2.3. Fractionation of “crude AbAEE”

Crude AbAEE was fractionated by two different methods.

2.3.1. Ultrafiltration membrane fractionation. Crude AbAEE fractionation by ultrafiltration was carried out using the following ultrafiltration membranes: 100 kDa, 20 kDa and 3 kDa. Briefly, crude AbAEE was ultrafiltered through a 100 kDa ultrafiltration membrane until a concentration factor of 10 is reached, obtaining UF-100; UF-100 was filtered through a 20 kDa ultrafiltration membrane until a concentration factor of 10 is reached, obtaining UF-20, and UF-20 was filtered through a 3 kDa ultrafiltration membrane until a concentration factor of 10 is reached, obtaining UF-3. 5 ml of raw AbAEE, UF-100, UF-20 and UF-3 were concentrated up to 0.5 ml by evaporation on a rotary evaporator (Büchi, Zurich, Switzerland), and then freeze-dried using a Telstar lyophilizer (Barcelona, Spain).

2.3.2. Chemical fractionation by sequential liquid-liquid extraction. Fractionation of UF-3 was performed by sequential LLE using three solvents (hexane, dichloromethane and ethyla-

cetate) characterized by different polarity index (pI) values, all of them being immiscible with water, according to the procedure described by Delgado-Povedano *et al.*, 2016.¹⁷ The two-phase system was centrifuged at 1500g for 5 min and each of the phases was collected. Five ml of each extract (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and the aqueous phase) was concentrated up to 0.5 ml in a speed-vac, and then freeze-dried using the Telstar lyophilizer (Barcelona, Spain).

2.4. Chemical analysis of the different fractions

The compositions of the different extracts were deeply analyzed according to the procedure described by others.¹⁷ Briefly, fractions were analyzed using a liquid chromatography (LC) system (Agilent 1200 series; Santa Clara, CA, USA) coupled to a mass spectrometer (MS) (Agilent 6540 UHD Accurate-Mass QTOF; Santa Clara, CA, USA). This equipment employs a dual electrospray ionization source (ESI) for the simultaneous spraying of a mass reference solution and continuous monitoring of the *m/z* ratios detected with high resolution. The Agilent MassHunter Workstation software was used to process raw MS data, including molecular feature extraction (MF), molecular formula generation, library search and databases. The analysis by LC was performed with an analytical column of a particle size of 5 μm , 250 \times 4.6 mm i.d. C18 Inertsil ODS-2 from GL Sciences Inc. (Torrance, CA, USA). The chromatograms were acquired at 225, 250, 260, 280 and 320 nm (maximum absorption wavelengths for most phenols). The identification of the compounds in the extracts was carried out by LC-Q-TOF-MS/MS analysis in high resolution mode. The data were collected at a rate of 1 spectrum per second in extended dynamic range mode (2 GHz). The precise mass spectra in the MS scan were acquired in the range of *m/z* 60–1100 and in the MS/MS mode in the range of *m/z* 31–1100. A search was performed in the METLIN MS and MS/MS databases (<http://metlin.scripps.edu>) and in the Human Metabolome Database (HMDB, version 3.6.).

2.5. Hepatitis C Virus NS3/4A protease assay

A fluorometric assay was performed using a SensoLyte® HCV protease assay kit, AnaSpec® (Fremont, CA, USA). This kit contains an HCV NS3/4A protease substrate, 5-FAM, which is a fluorescence reference standard, $E_{\text{x}}/E_{\text{m}} = 490 \text{ nm}/520 \text{ nm}$ upon cleavage, assay buffer, DTT and stop solution. Hepatitis C virus NS3/4A proteases (genotypes 1b, 2a and 3a) were obtained from AnaSpec (10 μL dissolved in 50 μL of 20 nM Tris-HCl, pH 8.0, 20% of glycerol, 100 nM KCl, 1 nM DTT and 0.2 nM EDTA, concentration: 0.2 mg mL^{-1}).

The SensoLyte® 520 HCV Protease Assay Kit provides a convenient assay for high throughput screening of HCV NS3/4A protease inhibitors and for continuous quantification of HCV NS3/4A protease activity using a 5-FAM/QXL™520 fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide. The sequence of this FRET peptide is derived from the cleavage site of NS4A/NS4B. In the FRET peptide, the fluorescence of 5-FAM is quenched by QXL™520. Upon cleavage into two separate fragments by HCV NS3/4A protease, the fluorescence of 5-FAM is recovered, and can be monitored at an excitation/emission rate

= 490 nm/520 nm. With superior fluorescence quantum yield and longer wavelength, the signal of 5-FAM is less interfered by the autofluorescence of cell components and test compounds. The assay can detect as low as 1.56 ng/22 ml active HCV NS3/4A protease.²³

Test solutions were prepared according to the manufacturer's recommendations (AnaSpec® Kit NS4/4A protease), and samples were analyzed in microplates. Activity assay was performed in a fluorescence microplate reader (Synergy Biotek, VT, USA) at $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

2.6. Cell culture

Human hepatoma (Huh7.5) cells were cultured (50 000 cells per well in 6 well plates) in low glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U mL^{-1} penicillin, 100 U mL^{-1} streptomycin, and 2 mM L-glutamine under a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO_2 (all from Invitrogen Life Technologies).

2.7. HCV production, titration and infection assay

To produce ccHCV particles, Huh-7.5 cells (4×10^6) were electroporated with 5 μg of *in vitro*-transcribed full-length JFH1 RNA²³ (genotype-2a) using an Amaxa Cell Line Nucleofector kit T (260 V, 950 μF Lonza). The culture supernatant was harvested after 72 h, filtered through 0.45 μm pore-sized polyvinylidene difluoride membranes, and titrated by infecting naive Huh-7.5 cells by serial dilutions. The cells were fixed after 72 h with -20°C methanol and immunostained using an anti-HCV core (C7-50) antibody. The tissue culture 50% infectious dose (TCID_{50}) was calculated as reported.²⁴ High-titer viral stocks were used to inoculate Huh7.5 cells at a MOI of 1.

2.8. HCV RNA level and replication assays

In vitro assays were conducted to assess the ability of *A. bisporus* extracts to inhibit HCV replication. Huh-7.5 cells were inoculated with JFH1-HCV. After 6 h incubation at 37 °C, the inoculum was removed. A viability test was carried out and it is explained in the ESI.† The toxicity study of the *A. bisporus* extract is shown in Tables 2S and 3S.† Among the three concentrations that showed lower levels of toxicity (1 mg mL^{-1} , 0.2 mg mL^{-1} and 0.1 mg mL^{-1}), we chose the 0.1 mg mL^{-1} concentration because it had the lowest level of toxicity in the viability test (3.47%) and for a dose-dependent hormesis effect, proven in another previous study (data not shown). Cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and replaced in culture medium containing either 0.1 mg mL^{-1} of soluble extracts or 50 μM quercetin (as a positive control). Replication of the HCV genome was assessed by measuring the intracellular levels of negative-strand HCV RNA using a strand-specific quantitative RT-PCR technique described previously.²⁵ HCV RNA amounts in filtered cell culture supernatants were quantified at 72 h post-infection using commercial standardized viral load assays: Roche COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0.

2.9. Immunoblot analyses

50 000 Huh7.5 cells were grown in 6-well plates. After 72 h of infection and treatment with quercetin (50 μM) and a mushroom soluble extract (0.1 mg ml^{-1}), cells were washed twice in ice-cold phosphate buffered saline (PBS), and then lysed using a commercial kit for protein extraction (M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific). The Qubit® Protein Assay was used for protein quantification.

For immunoblot analysis, total proteins were loaded on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and the resolved proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies: anti- β cytoplasmic actin, anti-core and anti-NS3 antibodies (see ESI Table 1S†), washed in TRIS-buffered saline (containing 0.1% Tween-20), and probed for 1 h with an appropriate HRP-conjugated secondary antibody (BioRad), at room temperature. Proteins were detected by chemiluminescence, according to manufacturer's instructions (WesternBright™ ECL, Advansta). Image analysis was performed using a ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad, Hercules, California, USA).

2.10 Ethical statement involving animal experiments

All animal care and experimental protocols were performed in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals from the University of Sevilla, and the European Community Policy for Experimental Animal Studies (permission numbers 09-10314-118 and 19602/2017/022). The study was approved by the University of Sevilla Animal Ethics Committee.

2.11. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Continuous variables were defined as means \pm SEM. Normal distribution was analyzed by the Shapiro-Wilks test. Comparisons between groups were made using the Student *t*-test or ANOVA test for continuous and normal variables. Depending on variance homogeneity, Bonferroni or T2 Tamhane correction tests were used. Two-sided *P* values < 0.05 were considered statistically significant (**p* < 0.05 , ***p* < 0.01 , ****p* < 0.001). Data were entered into a computerized database and analyzed using the SPSS package (SPSS 18.0 for Windows, Chicago, IL).

3. Results

The inhibition of HCV NS3/4A protease by crude *AbAEE* was detected, as a result of routine screening of inhibitors and activators of enzymes of potential medical-pharmaceutical interest. In this work, we focus on the study of different fractions obtained by UF and sequential LLE of the fraction with the highest inhibition activity, UF-3, obtained as described in the methods section, and the *in vitro* inhibition of HCV NS3/4A protease and HCV replication.

3.1. Fractionation and chemical analysis of the extracts

In an attempt to find the compound or compounds responsible of NS3 inhibition we fractionated *AbAEE* by ultrafiltration obtaining three fractions: UF-100, UF-20 and UF-3, and in a second procedure the fraction with the highest inhibition activity, UF-3, was fractionated by sequential LLE, obtaining four fractions: a hexane fraction (HF-3 kDa), dichloromethane fraction (DCMF-3 kDa), ethylacetate fraction (EAF-3 kDa) and aqueous fraction (AqF-3 kDa), and the *in vitro* inhibitory activity of each fraction against HCV NS3/4A protease was tested. Although inhibition of the protease NS3 was observed for all fractions, the highest degree of inhibition was observed for UF-3 (76.3 \pm 2.7%) and AqF-3 kDa (87.7 \pm 6.0%) (Fig. 1 and 2) in each fractionation group, as shown below.

3.2. NS3 inhibitory analysis

HCV NS3/4A *in vitro* inhibition was tested in UF fractions: UF-100, UF-20 and UF-3, and in chemical sequential LLE fractions: HF-3 kDa, DCMF-3 kDa, EAF-3 kDa and AqF-3 kDa.

3.2.1. HCV NS3/4A inhibition of crude *AbAEE* and UF-fractions. In order to obtain information about the size of the compound/s responsible of the activity, crude *AbAEE* was fractionated by ultra-filtration (see the methods section for details) obtaining the following three fractions: UF-100 (≤ 100 kDa), UF-20 (≤ 20 kDa), and UF-3 (≤ 3 kDa). These three fractions together with telaprevir (as a positive control) were tested for NS3 protease inhibition and the results are shown on Fig. 1. Protease activity levels (using genotype 1b recombinant NS3 protein) are expressed as percentages referred to as a negative control (100%) in the absence of inhibitors (E + S). An inhibition assay of crude *AbAEE* and its UF-fractions was per-

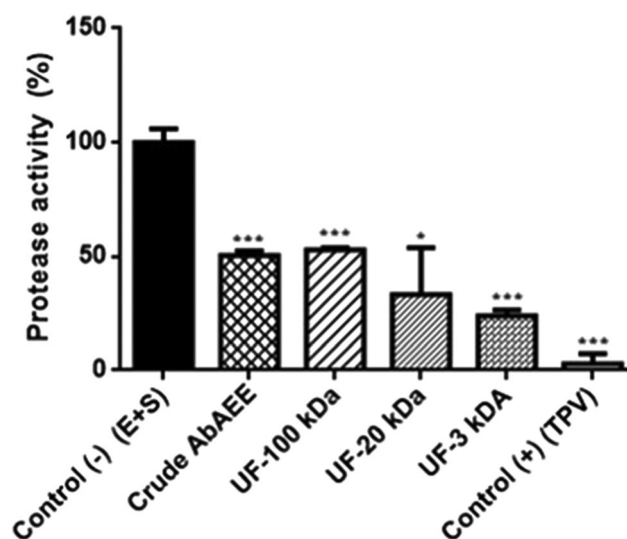


Fig. 1 HCV NS3/4A protease (genotype 1b) inhibition in the presence of different extracts of *A. bisporus* obtained by ultrafiltration. See the methods section for details. Control (-) (S + E): negative control (substrate + enzyme) (100% activity); control (+) (TPV): positive control (0.5 mM telaprevir). All data are means \pm SEM (*n* = 3). **p* ≤ 0.05 /****p* ≤ 0.01 /****p* ≤ 0.001 vs. control.

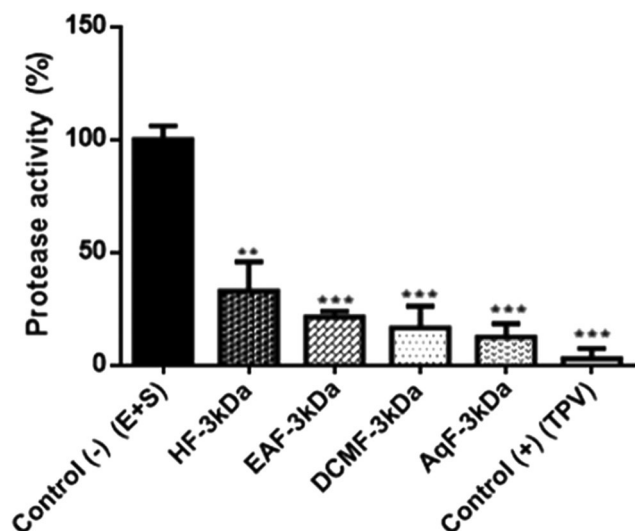


Fig. 2 HCV NS3/4A protease assay (genotype 1b) inhibition rates in the presence of different extracts of *A. bisporus* with different polarity index values. See the methods section for details. Control (-) (S + E): negative control (substrate + enzyme) (100% activity); control (+) (TPV): positive control (0.5 mM telaprevir). All data are means \pm SEM ($n = 3$). * $p \leq 0.05$ /** $p \leq 0.01$ /**p ≤ 0.001 vs. control.

formed using 20 μ l of the sample with 22.5 μ g of product ml^{-1} per assay. Protease activity levels were of $23.7 \pm 2.7\%$ ($p \leq 0.001$), $33.2 \pm 9.9\%$ ($p \leq 0.05$), $52.9 \pm 2.0\%$ ($p \leq 0.001$) and $50.41 \pm 2.1\%$ ($p \leq 0.001$), in UF-3, UF-20, UF-100 and crude AbAEE, respectively. These results show that the inhibition degree was $76.3 \pm 2.7\%$, $66.8 \pm 9.9\%$, $47.1 \pm 2.0\%$ and $49.59 \pm 2.1\%$, respectively. The differences between these values were probably due to different concentration of inhibitors during fractionation process. These results indicate the presence of an inhibitor or inhibitors of NS3/4A protease in all assayed fractions, and that this or these compound(s) is/are of low molecular weight (≤ 3 kDa).

3.2.2. HCV NS3/4A inhibition of UF-3 fractions obtained by sequential LLE. In order to obtain information about the chemical nature of the compound or compounds responsible for the inhibition of the NS3/4A protease *in vitro*, UF-3, the fraction with the highest inhibition activity, was fractionated by sequential LLE using three solvents with different polarity (hexane, dichloromethane and ethylacetate). UF-3 mainly contains polar compounds due to its aqueous character, but also no polar compounds are present in it. This complex composition justifies the selection of extractants with different polarity for sequential isolation of compounds pertaining to different families in order to enhance the coverage of the identified compounds.²⁶

The four fractions obtained by sequential LLE (HF-3 kDa, DCMF-3 kDa, EAF-3 kDa and AqF-3 kDa), using telaprevir (TPV) as a positive control, were tested for HCV NS3/4A protease inhibitory activity *in vitro*. The inhibition assay of UF3-LLE-fractions was performed using 20 μ l of the sample with 20.5 μ g of the product per ml per assay. The results are shown in Fig. 2. Protease activity levels (using genotype 1b recombinant NS3 protein) are expressed as percentages referring to the

trial in the absence of inhibitors (S + E), which has been assigned the highest percentage of activity (100%). The percentage of HCV NS3/4A activity was $12.3 \pm 6.0\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of AqF-3 kDa, $21.1 \pm 2.7\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of EAF-3 kDa, $16.4 \pm 9\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of DCMF-3 kDa, and finally, $32.8 \pm 13\%$ ($p \leq 0.01$) in the presence of HF-3 kDa, compared with the negative control. These data show that the inhibition degrees were: 87.7% (AqF-3 kDa), 83.6% (DMF-3 kDa), 78.9% (EAF-3 kDa) and 67.2% (HF-3 kDa). Organic extracts were reconstituted in DMSO and an aqueous UF-extract in distilled water; high levels of protease activity in the presence of DMSO and distilled water suggest that none of them interfere with the inhibitory activity (data not shown).

As shown, the highest inhibition of HCV NS3/4A activity is promoted by AqF-3 kDa (Fig. 2) and UF-3 kDa (Fig. 1), which present similar inhibitory activity: 87.7% and 76.3%. UF-3 and AqF-3 kDa have two characteristic in common: both are aqueous fractions, and both have similar compositions after LC-Q-TOF-MS analysis. The analysis by LC-Q-TOF-MS/MS of all the fractions obtained by sequential LLE allowed tentative identification of 110 compounds (Delgado-Povedano *et al.*, 2016¹⁷), rather than with UF-3. The analysis of UF-3, without fractionation, showed 90 compounds and the analysis of AqF-3 kDa showed 93 compounds, which can be attributed to chemical fractionation as it permits implementing dilution or pre-concentration steps for the different fractions as required. The fact that even after the extraction sequence more metabolites were identified in the remaining AqF-3 kDa than in UF-3 can be explained by the higher dilution of the latter (5 times more diluted). The following five compounds: ergothioneine, adenine, guanine, hypoxanthine and xanthine are present in all fractions (UF-3, AqF-3 kDa and organic fractions) showing NS3/4A inhibition. Our results are similar to those obtained by Delgado *et al.*, using crude AbAEE (Delgado-Povedano *et al.*, 2016¹⁷) (detailed identification of compounds, and a comparison with the results from the study by Delgado-Povedano *et al.*¹⁷ can be found in ESI Table 4S†).

3.3. Viral replication is hampered by *A. bisporus* extract

In order to evaluate the effect of UF-3 on HCV genome replication, Huh7.5 cells were infected with cell culture-produced HCV (ccHCV) of the JFH1 strain and treated with a 0.1 mg ml^{-1} concentration extract at which no toxic effect was observed (data not shown) for 48 hours. Quercetin and UF-3 significantly decreased the intracellular level of HCV RNA ($66.2\% \pm 1$; $p = 0.002$ and $93.3\% \pm 0.21$; $p = 0.001$, respectively) relative to the α -interferon-treated cells (500 IU mL^{-1} , $95.5\% \pm 0.3$ inhibition) (Fig. 3A). In addition, we evaluated the extracellular production of the viral particles. Culture supernatants were collected for determination of the extracellular HCV RNA level. We observed that both treatments with quercetin and UF-3 decrease the viral load by $39.7\% \pm 0.55$ ($p \leq 0.001$) and $33.6\% \pm 3.1$ ($p = 0.004$) respectively, which may be consequence of the inhibition of HCV genome replication (Fig. 3B).

The effects of quercetin and UF-3 were confirmed on viral proteins. Core and NS3 expression was inhibited by treatment

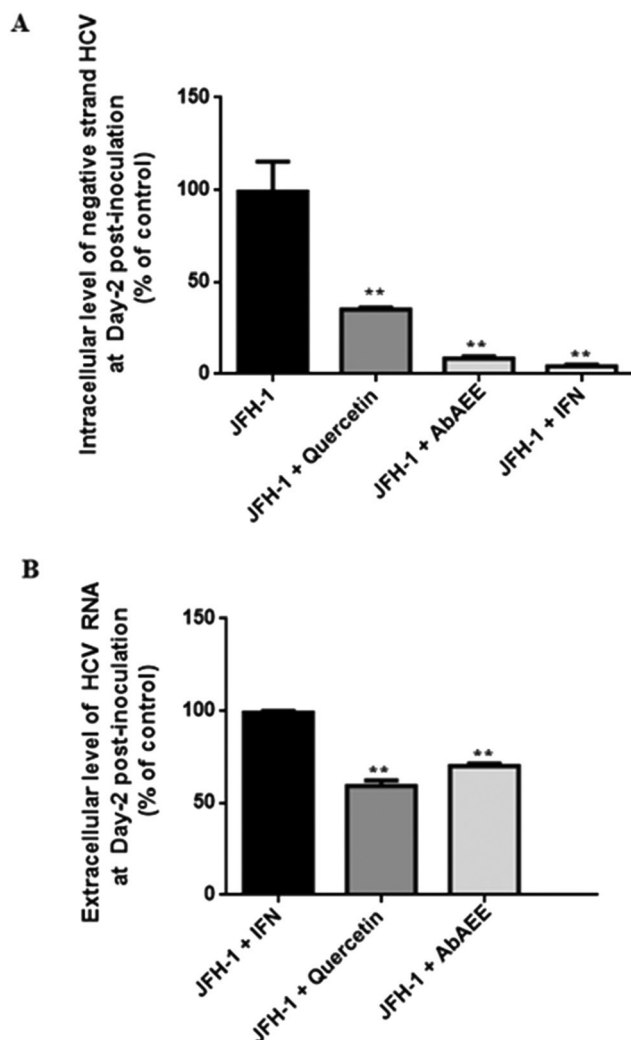


Fig. 3 HCV RNA levels in Huh7.5 cells infected with JFH1 (MOI of 1) treated with 50 μ M quercetin (JFH1 + Q50 μ M), 0.1 mg ml⁻¹ of mushroom extract and 500 UI ml⁻¹ α -interferon or DMSO as a carrier control. (A) Cells were lysed for quantification of negative-strand HCV RNA. (B) Culture supernatant was collected for determination of the extracellular HCV RNA level. Results are expressed as the percentage of the carrier control. All data are means \pm SEM ($n = 3$). * $p \leq 0.05$ /** $p \leq 0.01$ /*** $p \leq 0.001$ vs. control.

with 50 μ M quercetin for 72 h (0.49-fold \pm 0.13 and 0.72-fold \pm 0.04 decrease, respectively). In addition, UF-3 inhibited the HCV core and NS3 (0.08-fold \pm 0.04 and 0.02-fold \pm 0.02 decrease, respectively) being normalized with β -actin (Fig. 4).

Since a recombinant HCV NS3/4A protease assay was commercially available, we performed several experiments to assess the role of this protein in viral replication inhibition.

3.4. AbAEE and UF-3 inhibited different HCV genotype NS3

Full genome HCV replication inhibition was analyzed using JFH1 particles (genotype 2a). Besides commercially available genotype 1b, the inhibitory effect was also tested using recombinant NS3/4A from HCV genotypes 2a and 3a. Results are shown in Fig. 5. The percentage of HCV NS3/4A genotype 2a

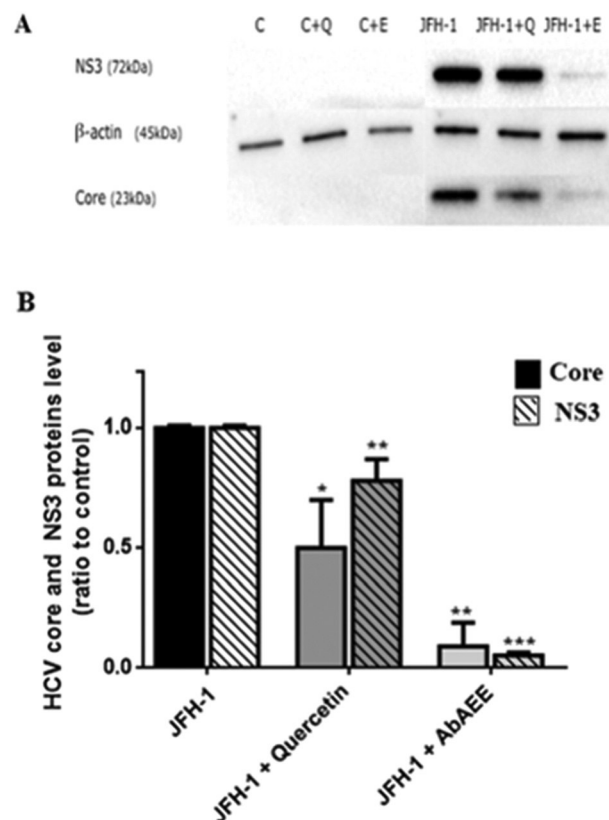


Fig. 4 (A) Representative immunoblot of NS3, core and β -actin in Huh7.5 cells transfected with JFH-1 RNA (HCV) and treated with 50 μ M quercetin (Q) or *A. bisporus* aqueous extract (E). (B) Graph represents NS3 and core protein quantification from at least three independent experiments. All data are means \pm SEM ($n = 3$). * $p \leq 0.05$ /** $p \leq 0.01$ /*** $p \leq 0.001$ vs. control.

activity was $22.5 \pm 3.0\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of crude AbAEE and $19.47 \pm 3.53\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of UF-3 kDa. Using HCV NS3/4A genotype 3a, the percentage of protease activity was $27.09 \pm 4.0\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of crude AbAEE and $31.79 \pm 2.27\%$ ($p \leq 0.001$) in the presence of UF-3 kDa. Extracts from *A. bisporus* were able to inhibit significantly the viral protease.

4. Discussion

The main finding in this work shows that different hydrophilic fractions obtained from *A. bisporus* inhibited HCV viral replication *in vitro*, making it possible for these extracts to inhibit *in vivo* HCV replication. These data support the observation shown by Grindler *et al.*, where edible mushroom extracts (*Agaricus blazei*) showed beneficial effects in hepatitis C treatment. This group indicates a possible mechanism of action as over-stimulation of the host immune system. We think that a more likely pathway would be through the inhibition of the HCV NS3/4A protease. For this reason, we performed a partial characterization of mushroom extracts.

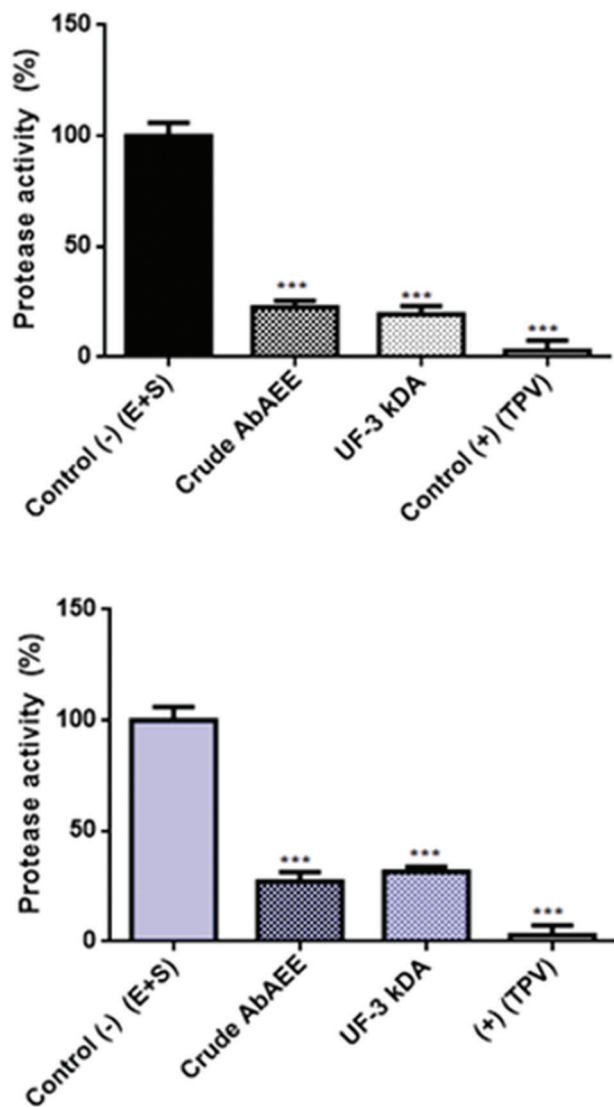


Fig. 5 HCV NS3/4A protease inhibition in the presence of different extracts of *A. bisporus* obtained by ultrafiltration (crude AbAEE and UF-3 kDa), using (A) HCV genotype 2a recombinant NS3/4A protein. (B) HCV genotype 3a NS3/4A. Control (-) (S + E): negative control (substrate + enzyme) (100% activity); control (+) (TPV): positive control (0.5 mM telaprevir). All data are means \pm SEM ($n = 3$). * $p \leq 0.05$ /** $p \leq 0.01$ /**p ≤ 0.001 vs. control.

Data from fluorometric assays suggest that the possible inhibitory compounds have a polar character. This is because the levels of the NS3/4A protease are reduced (85–90%) in the presence of extracts obtained from the cap and reconstituted in polar solvents (distilled water, ethyl acetate and dichloromethane). These data allow us to assign an inhibitory function to low molecular weight and polar character molecules, such as oligosaccharides, oligopeptides or secondary metabolites.

According to these results, we performed further assays with ultra-filtered extracts (3 kDa, 10–20 kDa, and 90–180 kDa). The 3 kDa fraction showed an 80% inhibition rate. Notably, the molecular weights of oligoglucans, oligopeptides and secondary metabolites are within this value

(≤ 3 kDa).²⁷ These data support the hypothesis that such components are involved in the HCV NS3/4A serine protease inhibition, based on the size and the ability to interfere with the enzyme active site.²⁸ The mushroom cap contains low-molecular-weight oligopeptides and oligoglucans, chitin, polyphenols, vitamins and secondary metabolites. The stems contain especially high-molecular-weight chitin, glucans and proteins.^{29,30} Beta glucans seem to play a role in the activation of the immune system, stimulating the liberation of cytokines.³¹

Based on our data, we can argue that inhibitory compounds are of low molecular weight and are polar character molecules. We think that in the pre-homogenization process of mushrooms (washed with citrate solution), these compounds may be released.

The high percentage of enzyme activity inhibition in the presence of crude extracts has the advantage of a simple and economical production and purification of these compounds. In addition, we have been able to observe its effectiveness in different HCV genotypes, since, although most of the experiments were carried out with the HCV genotype 1b, Fig. 5 shows significant levels of protease inhibition, compared to the positive control telaprevir, for HCV genotypes 2a and 3a. Therefore, the inhibitory ability of mushroom extracts is not limited or specific to a single HCV NS3/4A genotype. In this way, the compounds present in the cap of mushroom could compete or complement therapies with current synthetic drugs (boceprevir, telaprevir and sofosbuvir),³² whose high prices are not accessible to most of the patients with hepatitis. The purification process and dose normalization. Purification process does not significantly increase the price of the extracts, since these methods are fast and simple processes, which do not require a high cost. In this study, we used 3 different batches of *A. bisporus* in a previous experiment, obtaining similar results, so that the consistency of the study would not be compromised using different sources or batches of mushrooms. Moreover, toxicity tests were performed in rats with high concentrations (750 mg ml⁻¹) of extracts in water (see ESI Table 5S†). After 2 weeks of testing, no death or toxicity was observed after pathological examination of the liver, lungs, heart and intestines. Thus, we propose the consumption of mushroom extracts as a non-toxic, cheap and preventive alternative against hepatitis C.

5. Conclusion

In conclusion, we have shown that there are HCV NS3/4A (genotypes 1b, 2a and 3a) serine protease inhibitory compounds in edible mushroom (*A. bisporus*) aqueous extracts. These inhibitors are found mainly in the cap, not in the stems. The possible inhibitors have a polar character and low molecular weight, and they may be oligoglucans, oligopeptides or other secondary metabolites. In addition, the BW fraction could be a cheap alternative source for these inhibitors.

Therefore, based on our results, we proposed the use of mushroom extracts for prevention/prophylaxis against infection by HCV, competing with current expensive treatments. Alternatively, the use of these extracts could minimize the effect of resistance-associated variants which have been related to the treatment failure of HCV therapy with direct-acting antiviral drugs.³³ In addition, it would be interesting to evaluate the potential of these extracts against other viral NS3 proteases from flaviviruses such as Dengue, West Nile and Yellow fever virus.

Abbreviations

AbAEE	<i>Agaricus bisporus</i> aqueous enzymatic extract
BPV	Boceprevir
ccHCV	Cell culture-produced HCV
DAAAs	Direct-acting antivirals
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ER	Endoplasmic reticulum
ET	Ergothioneine
FBS	Fetal bovine serum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
HCV	Hepatitis C virus
Huh7.5	Human hepatoma cell
LDL	Low-density lipoproteins
LLE	Liquid liquid-extraction
PBS	Phosphate-buffered saline
PEG-IFN	Pegylated interferon
Q	Quercetin
SDS-PAGE	Dodecyl sulphate-polyacrylamide gels
TCID ₅₀	Tissue culture 50% infectious dose
TPV	Telaprevir
VLDL	Very-low density lipoproteins

Author contributions

PG, JdC, JB, and MRG designed the study and wrote the manuscript. PG, JB and JdC analyzed the data. AR, GF, PC, MGL, LG, and AG contributed towards performing experiments and data analysis.

Funding sources

This work has been supported by grants #PI0892-2012, from the Andalusian Government; Project "PI14/01349", funded by Instituto de Salud Carlos III, integrated in the national I + D + i 2013–2016 and co-funded by the European Union (ERDF/ESF, "Investing in your future"), and Project "RTC-2015-4039-2," funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the FEDER program.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work has been supported by grants #PI0892-2012, from the Andalusian Government; PI14/01349, from the Instituto de Salud Carlos III, Spain, and RTC-2015-4039-2, from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and FEDER program. We thank Paula Bautista for her assistance in the preparation of the manuscript.

References

- 1 Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome, *Science*, 1989, **244**, 359–362.
- 2 R. Thomssen, S. Bonk, C. Propfe, K.-H. Heermann, H. G. Köchel and A. Uy, Association of hepatitis C virus in human sera with γ -lipoprotein, *Med. Microbiol. Immunol.*, 1992, **181**, 293–300.
- 3 M. P. Manns and T. von Hahn, Novel therapies for hepatitis C - one pill fits all?, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2013, **12**, 595–610.
- 4 J. P. Messina, I. Humphreys, A. Flaxman, A. Brown, G. S. Cooke, O. G. Pybus and E. Barnes, Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes., *Hepatology*, 2015, **61**, 77–87.
- 5 O. Isken, U. Langerwisch, V. Jirasko, D. Rehders, L. Redecke, H. Ramanathan, B. D. Lindenbach, R. Bartenschlager and N. Tautz, Correction: A Conserved NS3 Surface Patch Orchestrates NS2 Protease Stimulation, NS5A Hyperphosphorylation and HCV Genome Replication, *PLoS Pathog.*, 2016, **12**, e1005394.
- 6 C. Sarrazin, H. Dvory-Sobol, E. S. Svarovskaia, B. P. Doehle, P. S. Pang, S.-M. Chuang, J. Ma, X. Ding, N. H. Afdhal, K. V. Kowdley, E. J. Gane, E. Lawitz, D. M. Brainard, J. G. McHutchison, M. D. Miller and H. Mo, Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and Outcomes of Treatment With Ledipasvir and Sofosbuvir, *Gastroenterology*, 2016, **151**, 501–512.e1.
- 7 C. Sarrazin, E. Lathouwers, M. Peeters, B. Daems, A. Buelens, J. Witek, Y. Wyckmans, B. Fevery, T. Verbinen, A. Ghys, M. Schlag, A. Baldini, S. De Meyer and O. Lenz, Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80 K in genotype 1 patients in the European region., *Antiviral Res.*, 2015, **116**, 10–16.
- 8 M. Varedi, The Jak-Stat Signaling Pathway of Interferons System: Snapshots, *Iran. J. Immunol.*, 2005, **2**, 67–77.
- 9 W. P. Hofmann and S. Zeuzem, A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011, **8**, 257–264.
- 10 D. Y. Kim, S. H. Ahn and K.-H. Han, Emerging therapies for hepatitis C., *Gut Liver*, 2014, **8**, 471–479.
- 11 J. Dietz, D. Rupp, S. Susser, J. Vermehren, K.-H. Peiffer, N. Filmann, D. Bon, T. Kuntzen, S. Mauss, G. Grammatikos, D. Perner, C. Berkowski, E. Herrmann,

- S. Zeuzem, R. Bartenschlager and C. Sarrazin, Investigation of NS3 Protease Resistance-Associated Variants and Phenotypes for the Prediction of Treatment Response to HCV Triple Therapy, *PLoS One*, 2016, **11**, e0156731.
- 12 M. J. Sofia, D. Bao, W. Chang, J. Du, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, P. G. Reddy, B. S. Ross, P. Wang, H.-R. Zhang, S. Bansal, C. Espiritu, M. Keilman, A. M. Lam, H. M. M. Steuer, C. Niu, M. J. Otto and P. A. Furman, Discovery of a β -D-2'-Deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C Virus, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 7202–7218.
 - 13 L. Bachmetov, M. Gal-Tanamy, A. Shapira, M. Vorobeychik, T. Giterman-Galam, P. Sathiyamoorthy, A. Golan-Goldhirsh, I. Benhar, R. Tur-Kaspa and R. Zemel, Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity., *J. Viral Hepatitis*, 2012, **19**, e81–e88.
 - 14 R. Khachatoorian, V. Arumugaswami, S. Raychaudhuri, G. K. Yeh, E. M. Maloney, J. Wang, A. Dasgupta and S. W. French, Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle., *Virology*, 2012, **433**, 346–355.
 - 15 B. U. Reddy, R. Mullick, A. Kumar, G. Sudha, N. Srinivasan and S. Das, Small molecule inhibitors of HCV replication from pomegranate, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 5411.
 - 16 A. Furuta, K. A. Salam, I. Hermawan, N. Akimitsu, J. Tanaka, H. Tani, A. Yamashita, K. Moriishi, M. Nakakoshi, M. Tsubuki, P. W. Peng, Y. Suzuki, N. Yamamoto, Y. Sekiguchi, S. Tsuneda and N. Noda, Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge., *Mar. Drugs*, 2014, **12**, 462–476.
 - 17 M. del M. Delgado-Povedano, V. Sánchez de Medina, J. Bautista, F. Priego-Capote and M. D. Luque de Castro, Tentative identification of the composition of *Agaricus bisporus* aqueous enzymatic extracts with antiviral activity against HCV: A study by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high resolution mode, *J. Funct. Foods*, 2016, **24**, 403–419.
 - 18 R. Linnakoski, D. Reshamwala, P. Veteli, M. Cortina-Escribano, H. Vanhanen and V. Marjomäki, Antiviral Agents From Fungi: Diversity, Mechanisms and Potential Applications, *Front. Microbiol.*, 2018, **9**, 2325.
 - 19 L. Xiao, L. Zhao, T. Li, D. K. Hartle, O. I. Aruoma and E. W. Taylor, Activity of the dietary antioxidant ergothioneine in a virus gene-based assay for inhibitors of HIV transcription., *Biofactors*, 2006, **27**, 157–165.
 - 20 B. D. Lindenbach, M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wölk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating and C. M. Rice, Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture, *Science*, 2005, **309**, 623–626.
 - 21 T. K. H. Scheel and C. M. Rice, Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies., *Nat. Med.*, 2013, **19**, 837–849.
 - 22 O. Cremades, M. M. Diaz-Herrero, P. Carbonero-Aguilar, J. F. Gutierrez-Gil, E. Fontiveros, B. Rodríguez-Morgado, J. Parrado and J. Bautista, Preparation and characterisation of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*), *Food Chem.*, 2012, **133**, 1538–1543.
 - 23 T. Wakita, T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager and T. J. Liang, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, *Nat. Med.*, 2005, **11**, 791–796.
 - 24 T. Pietschmann, A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.-L. Cosset and R. Bartenschlager, Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 7408–7413.
 - 25 M. Carrière, V. Pène, A. Breiman, F. Conti, S. Chouzenoux, E. Meurs, M. Andrieu, P. Jaffray, L. Grira, O. Soubrane, P. Sogni, Y. Calmus, S. Chaussade, A. R. Rosenberg and P. Podevin, A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication, *J. Med. Virol.*, 2007, **79**, 155–160.
 - 26 P. Kalač, Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review, *Food Chem.*, 2009, **113**, 9–16.
 - 27 P. Manzi and L. Pizzoferrato, Beta-glucans in edible mushrooms, *Food Chem.*, 2000, **68**, 315–318.
 - 28 N. Tautz, A. Kaiser and H.-J. Thiel, NS3 Serine Protease of Bovine Viral Diarrhea Virus: Characterization of Active Site Residues, NS4A Cofactor Domain, and Protease–Cofactor Interactions, *Virology*, 2000, **273**, 351–363.
 - 29 F. Nasiri, B. Ghiassi Tarzi, A. R. Bassiri, S. E. Hoseini and M. Aminafshar, Comparative Study on the Main Chemical Composition of Button Mushroom's (*Agaricus bisporus*) Cap and Stipe, *J. Food Biosci. Technol.*, 2013, **3**, 41–48.
 - 30 J. Vetter, Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*, *Food Chem.*, 2007, **102**, 6–9.
 - 31 B. Grinde, G. Hetland and E. Johnson, Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection, *Int. Immunopharmacol.*, 2006, **6**, 1311–1314.
 - 32 S. Iyengar, K. Tay-Teo, S. Vogler, P. Beyer, S. Wiktor, K. de Joncheere, S. Hill, E. Gower, C. Estes, S. Blach, K. Razavi-Shearer, H. Razavi, P. Feuerstadt, A. Bunim, H. Garcia, J. Karlitz, H. Massoumi, A. Thosani, M. Fried, S. Zeuzem, G. Dusheiko, R. Salupere, A. Mangia, R. Flisiak, R. Hyland, N. Afdhal, K. Reddy, D. Nelson, E. Lawitz, S. Gordon, E. Schiff, K. Bichoupan, V. Martel-Lafferriere, D. Sachs, M. Ng, E. Schonfeld, A. Pappas, D. Ollendorf, J. Tice, S. Pearson, A. Hill, S. Khoo, J. Fortunak, B. Simmons, N. Ford, R. Sullivan, J. Peppercorn, K. Sikora, J. Zalberg, N. Meropol, E. Amir, A. Tefferi, H. Kantarjian, S. Rajkumar, L. Baker, J. Abkowitz, J. Adamson, S. Barua, R. Greenwald,

- J. Grebely, G. Dore, T. Swan, L. Taylor, I. Andrieux-Meyer, J. Cohn, E. de Araujo, S. Hamid, W. Bank, D. Lavanchy, J. Grebely, M. Prins, M. Hellard, A. Cox, W. Osburn, G. Lauer, E. Cunningham, T. Applegate, A. Lloyd, G. Dore, J. Grebely, C. Long, K. DeBeck, C. Feng, J. Montaner, E. Wood, T. Kerr, A. Cameron, A. Bansal, T. Dua, S. Hill, S. Moshe, A. Mantel-Teeuwisse, A. Cameron, M. Ewen, D. Ross-Degnan, D. Ball, R. Laing, S. Vogler, N. Zimmermann, C. Habl, J. Piessnegger, A. Bucsics, J. Nguyen, J. Rich, B. Brockmann, F. Vohr, A. Spaulding, B. Montague, J. Chhatwal, F. Kanwal, M. Roberts, M. Dunn, J. Kieran, K. Bennett, M. Coghlan, C. Bergin, M. Barry, J. Jakubiak-Lasocka, M. Jakubczyk, J. Skoupá, L. Annemans, P. Hájek, C. Leopold, S. Vogler, A. Mantel-Teeuwisse, K. de Joncheere, H. Leufkens, R. Laing, G. Koçkaya, P. Kiliç, E. Hoen, J. Berger, A. Calmy, S. Moon, B. Waning, E. Diedrichsen, S. Moon, V. Wirtz, Y. Santa-Ana-Tellez, C. Trout, W. Kaplan, S. Ramani, E. Urias, A. Towse, M. Pistollato, J. Mestre-Ferrandiz, Z. Khan, S. Kaura and L. Garrison, Prices, Costs, and Affordability of New Medicines for Hepatitis C in 30 Countries: An Economic Analysis, *PLoS Med.*, 2016, **13**, e1002032.
- 33 M. Á. Jimenez-Sousa, M. Gutiérrez-Rivas, A. Álvaro-Meca, M. García-Álvarez, P. R. Harrigan, C. G. Fedele, V. Briz, S. Vázquez-Morón, S. Resino, J. Gutierrez, E. Lawitz, F. Poordad, C. Sarrazin, E. Lontok, P. Harrington, A. Howe, T. Kieffer, J. Lennerstrand, O. Lenz, O. Lenz, T. Verbinen, B. Fevery, L. Tambuyzer, L. Vijgen, M. Peeters, B. Pickett, R. Striker, E. Lefkowitz, S. Bagaglio, C. Uberti-Foppa, E. Messina, M. Merli, H. Hasson, A. Andolina, A. De Luca, S. Di Giambenedetto, A. Lo Presti, S. Sierra, M. Prosperi, E. Cella, A. Bae, S. Sun, X. Qi, X. Chen, K. Ku, A. Worth, L. Nguyen, E. Gray, J. Dean, M. Carr, J. Connell, C. De Gascun, A. Beloukas, S. King, K. Childs, A. Papadimitropoulos, M. Hopkins, M. Atkins, S. Shepherd, T. Abdelrahman, A. MacLean, E. Thomson, C. Aitken, R. Gunson, V. Morel, G. Duverlie, E. Brochot, I. Vicenti, A. Rosi, F. Saladini, G. Meini, F. Pippi, B. Rossetti, M. Leggewie, V. Sreenu, T. Abdelrahman, E. Leitch, G. Wilkie, T. Klymenko, C. Sarrazin, E. Lathouwers, M. Peeters, B. Daems, A. Buelens, J. Witek, L. Vidal, M. Soares, A. Santos, T. Ruggiero, A. Proietti, L. Boglione, M. Milia, T. Alice, E. Burdino, C. Jabara, F. Hu, K. Mollan, S. Williford, P. Menezes, Y. Yang, R. Ehret, S. Neifer, H. Walter, A. Baumgarten, M. Obermeier, Y. Cao, Y. Zhang, Y. Bao, R. Zhang, X. Zhang, W. Xia, G. Lisboa-Neto, C. Noble, J. Pinho, F. Malta, M. Gomes-Gouvea, M. Alvarado-Mora, D. Bradshaw, G. Matthews, M. Danta, N. Parikh, M. Nonnemacher, V. Pirrone, T. Block, A. Mehta, B. Wigdahl, R. McCloskey, R. Liang, J. Joy, M. Krajden, J. Montaner and P. Harrigan, NS3 Resistance-Associated Variants (RAVs) in Patients Infected with HCV Genotype 1a in Spain, *PLoS One*, 2016, **11**, e0163197.



Review

Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

José A Del Campo ^{1,*}, Rocío Gallego-Durán ², Paloma Gallego ¹ and Lourdes Grande ¹

¹ Valme University Hospital, Department of Digestive Diseases & CIBERehd, Servicio Andaluz de Salud, University of Sevilla, 41014 Sevilla, Spain; palgalyer@alum.us.es (P.G.); lourdes.grande.sspa@juntadeandalucia.es (L.G.)

² Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) & CIBERehd, 41012 Sevilla, Spain; rociogallegoduran@gmail.com

* Correspondence: jantonio.delcampo@ciberehd.org

Received: 27 February 2018; Accepted: 15 March 2018; Published: 19 March 2018

Abstract: Genetics and epigenetics play a key role in the development of several diseases, including nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Family studies demonstrate that first degree relatives of patients with NAFLD are at a much higher risk of the disease than the general population. The development of the Genome Wide Association Study (GWAS) technology has allowed the identification of numerous genetic polymorphisms involved in the evolution of diseases (e.g., *PNPLA3*, *MBOAT7*). On the other hand, epigenetic changes interact with inherited risk factors to determine an individual's susceptibility to NAFLD. Modifications of the histones amino-terminal ends are key factors in the maintenance of chromatin structure and gene expression (cAMP-responsive element binding protein H (CREBH) or SIRT1). Activation of SIRT1 showed potential against the physiological mechanisms related to NAFLD. Abnormal DNA methylation represents a starting point for cancer development in NAFLD patients. Besides, the evaluation of circulating miRNA profiles represents a promising approach to assess and non-invasively monitor liver disease severity. To date, there is no approved pharmacologic therapy for NAFLD and the current treatment remains weight loss with lifestyle modification and exercise. In this review, the status of research into relevant genetic and epigenetic modifiers of NAFLD progression will be discussed.

Keywords: NAFLD; genetics; epigenetics; miRNAs; SIRT1; *PNPLA3*

1. Introduction

In 1980, a number of patients who had histopathological changes indistinguishable from alcoholic liver disease were described for the first time, but in whom alcohol intake was nil or non-significant [1]. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises a progressive spectrum of diseases ranging from hepatic steatosis-accumulation of fat in hepatocytes from an initially benign character to nonalcoholic steatohepatitis, characterized by inflammatory infiltrate and hepatocyte damage (which includes ballooning and cell death) together with deposition of collagen and fibrosis progression, although simple steatosis may promote fibrosis progression [2]. This disease is diagnosed in the absence of significant alcohol consumption, presence of other hereditary diseases, consumption of drugs that can induce steatosis and viral infections (hepatitis B and C virus, human immunodeficiency virus (HIV)) [3].

Simple steatosis and steatohepatitis show different natural histories and consequences. This pathology has been associated with an increased mortality rate, 5–10 times higher than in the general population [4]. After the establishment of steatohepatitis, up to 30% of patients can develop cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) in 10 years, although HCC may typically also develop in non-fibrotic livers and simple steatosis may also have a progressive course [4,5]. In addition,

steatohepatitis is considered the greatest predictor of fibrosis progression and has been described as a key pathogenic process related to systemic disorders, especially cardiovascular risk [6–9].

NAFLD is currently considered the most common liver disease in developed countries [10]. Its global prevalence in the general population is variable; in the Eastern countries it is 20–30% and in Asia 5–18% [11]. The reason for this variability is not clear yet, but presumably genetic and epigenetic factors could play a major role. The incidence of NAFLD is two new cases per 100 people per year, and up to 50% of the general population is expected to be affected by 2030. Despite being a very common condition, NAFLD tends to be under-diagnosed.

Its development is closely related to the characteristics of the metabolic syndrome, such as central obesity, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, arterial hypertension and dyslipidemia [12]. In discussing the biological mechanisms underpinning the relationship between NAFLD and chronic vascular complications of diabetes mellitus, there is emerging evidence that suggests a link between dysbiosis, intestinal barrier dysfunction, mediators of the gut microbiota and cardiovascular diseases [13]. Hepatic fat accumulation generates multiple signals that alter lipid and glucose metabolism, leading to the presence of intracellular fat vacuoles, lack of the ability to perform the mitochondrial beta-oxidation process, generation of oxidative stress, development of pro-inflammatory mechanisms and, finally, hepatocellular apoptosis [14–16].

Liver biopsy is the current reference method for the diagnosis and staging of both fibrosis and steatohepatitis. It is usually recommended to patients with elevated transaminases with no affiliated origins and for which other risk factors have been excluded. However, it is an invasive, expensive and time-consuming method, presenting inherent risks, since it is associated with increased morbidity, which in some cases can lead to complications such as bleeding and even death [17]. Among pathologists, the most common method for diagnosis is the NAS score (NAFLD Activity Score) [17] which provides a score based on the degree of steatosis (0–3), lobular inflammation (0–3) and ballooning degeneration (0–2). A score >5 would be confirmatory of steatohepatitis, whereas if it is inferior to 3, this injury would be unlikely. In addition, taking into account that common treatments for this pathology are still ineffective, the first line of action for this type of patients would be weight loss, which would be achieved with a decrease in caloric intake and an increase in physical activity. Lifestyle intervention can be effective when treating non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) patients and clinical evidence strongly supports the role of lifestyle modification as a primary therapy for the management of NAFLD and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [18].

To establish proper diagnosis, prognosis and appropriate therapeutic management, it would be essential to differentiate between steatohepatitis and simple steatosis, taking into account the systemic complications of this disease. Besides, diagnosing fibrosis represents a key role, since its presence is a major determinant of the natural course of hepatic and extra-hepatic disease.

2. Genetics in NAFLD

There is a considerable inter-individual variation in terms of severity and risk of morbidity and mortality associated with NAFLD. The pathogenesis of NAFLD is thought to be a multifactorial and complicated disease associated with lifestyle habits, nutritional factors and genetics. However, the pathogenesis and underlying mechanism in the development of NAFLD caused by genetics remains unclear. The function of gene polymorphisms, which implicate Insulin resistance (IR), fatty acid metabolism, oxidative stress and hepatofibrogenesis, are reflected in every part of the pathogenesis of NAFLD [19].

The development of the Genome Wide Association Study (GWAS) technology has allowed the identification of numerous genetic polymorphisms involved in the evolution of diseases, since they can alter the stages of development, susceptibility to disease, rate of progression and efficacy of the treatment. In 2008, the first GWAS was published in NAFLD [20] patients and 9229 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed in a population of varied ethnicity in order to search for genetic variants associated with the disease. This study detected that SNP rs738409 of the gene-like

phospholipase domain-containing protein 3 (*PNPLA3*) was strongly associated with accumulation of fat in the hepatocyte in a cohort of more than 2000 ethnically diverse patients. This association remained significant even though it was adjusted for body mass index (BMI), diabetes mellitus, alcohol intake and ethnicity. Later, other approaches of this type have been carried out, identifying new candidate genes, but in which *PNPLA3* has always remained significantly associated to disease development [21]. Numerous studies have validated this relationship, and new findings have been made, such as its relationship to alanine transaminase (ALT) serum levels and the full spectrum of NAFLD, including simple steatosis, steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, as well as systemic disorders more frequent in these patients, such as cardiovascular risk. Numerous studies have validated this relationship [22,23], and new findings have been made, such as its relationship to ALT [24] serum levels and the full spectrum of NAFLD, including simple steatosis, steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [25,26], as well as systemic disorders more frequent in these patients, such as cardiovascular risk.

In humans, *PNPLA3* is located on the long arm of chromosome 22. The specific SNP rs738409 (rs738409 C>G) has the peculiarity that it encodes an amino acid substitution from isoleucine to methionine at position 148; I148M). *PNPLA3* encodes a triacylglycerol lipase, also called adiponutrin, which is involved in the hydrolysis of triacylglycerol in the adipocytes. Such a hydrolase activity may not be present in those patients presenting the I148M variant [27], since this amino acid substitution near the catalytic domain reduces its enzymatic activity and favors the development of steatosis [28], which in other words would be considered a loss of function. This would have an impact similar to other factors, such as environmental stress, obesity or alcohol consumption, affecting the predisposition for the disease to progress. This protein is expressed in the endoplasmic reticulum, hepatocyte lipid membranes and adipose tissue [29]. It has been also demonstrated that adiponutrin circulates in human plasma, and that its concentration oscillates between 1.25 and 4 nM, posing as a possible biomarker of the disease [30].

Basuray et al. [31] have generated a line of knock-in mice introducing a methionine codon at position 148 of the *Pnpla3* gene in female C57BL/6J mice. This study provides solid evidence to affirm that the presence of this variant favors the development of NAFLD. These mice show normal levels of fat in the liver while maintained on a standard diet. When a sucrose-rich diet is applied, intrahepatocyte fat levels were increased 2–3 times more compared to controls, without detecting changes in glucose homeostasis. In addition, these mice showed an increase of up to 40-fold in the levels of catalytically inactive adiponutrin in the lipid droplets, without overexpression of *PNPLA3* mRNA in the liver.

In recent years, the deleterious effect of the G allele of this *PNPLA3* SNP has been described. This has been associated with an additive effect in the development of a broad spectrum of liver diseases, such as alcoholic cirrhosis [32], viral hepatitis [33], and even hepatocarcinoma [25]. The carriers of the G allele are 2.26 times more likely to develop liver cancer, with GG homozygotes up to five times more at risk. In addition, it has been described that although carriers of the GG genotype have an increased risk of developing NAFLD, they are also more susceptible to the beneficial effects that an intervention provides at the level of lifestyle [34].

Recently, it has been shown that the *MBOAT7* locus is associated with increased hepatic fat content in two cohorts and with the entire spectrum of histological liver damage related to NAFLD [35]. This association is mediated by lower hepatic protein expression of Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 7 (*MBOAT7*) resulting in changes in the hepatic phosphatidylinositol acyl-chain remodeling. Moreover, it has been demonstrated that the *MBOAT7* rs641738 T allele is associated with reduced *MBOAT7* expression and may predispose to HCC in patients without cirrhosis, suggesting it should be evaluated in future prospective studies aimed at stratifying NAFLD-HCC risk [36].

Besides *PNPLA3* and *MBOAT7*, other genetic variants have been described to promote NAFLD progression. These variants have been summarized in Table 1. In this sense, transmembrane 6 superfamily member 2 (*TM6SF2*) is involved in the enrichment of triglycerides to apolipoprotein B100

in the pathway of very low-density lipoprotein secretion from the hepatocytes [37]. The rs58542926 C>T polymorphism in this gene results in a loss-of-function, inducing higher liver triglyceride content and lower circulating lipoproteins. In experimental models, silencing of TM6SF2 reduces secretion of very-low-density lipoproteins (VLDLs) and causes a predisposition to retention of triglycerides (TGs) in hepatic lipid droplets and fatty liver [37,38]. Dongiovanni et al. [39] have shown that TM6SF2 E167K variation is associated with NASH, hepatocellular ballooning, and necroinflammation in humans. Moreover, a robust association between this variant and histological severity of steatosis and fibrosis has been shown.

Table 1. Genetic variants (SNPs) associated to NAFLD progression.

Gene	Function	Phenotype	Variant
<i>PNPLA3</i>	Lipid droplets	↑ NAFLD, NASH, fibrosis, HCC	rs738409 C>G
<i>MBOAT7</i>	Phospholipid metabolism	↑ NAFLD-HCC risk	rs641738 C>T
<i>APOB</i>	VLDL secretion	↑ NAFLD, NASH, fibrosis, HCC	Several
<i>TM6SF2</i>	VLDL secretion	↑ NAFLD, NASH, fibrosis	rs58542926 C>T
<i>GCKR</i>	De novo lipogenesis regulation	↑ NAFLD, NASH, fibrosis	rs780094 A>G
<i>KLF6</i>	De novo lipogenesis regulation; fibrogenesis	↓ fibrosis	rs3750861 G>A
<i>IL28B</i>	Innate immunity, alternative IFNL3/4 transcription	↓ fibrosis	rs12979860 C>T
<i>SOD2</i>	Mitochondrial antioxidant	↑ fibrosis	rs4880 C>T

APOB, Apolipoprotein B; *KLF6*, Krueppel-like factor 6; *IL28B*, interleukin 28B; *SOD2*, Superoxide dismutase 2; VLDL: very low-density lipoproteins. ↑—increased, ↓—decreased.

Variation in the glucokinase regulator (GCKR) gene locus has been also associated with NAFLD [40]. GCKR regulates de novo lipogenesis by controlling the influx of glucose in hepatocytes. Loss-of-function GCKR mutation (rs1260326) encoding the P446L protein variant, leads to decreased circulating fasting glucose and insulin levels and increased hepatic fat accumulation by blocking fatty acid oxidation [39].

The association between the IFN- λ 3/IFN- λ 4 locus, hepatic inflammation and fibrosis has recently been confirmed in a large multi-center cohort of patients with NAFLD, in whom the impact of this variant was larger in non-obese than obese individuals [41,42].

3. Epigenetics in NAFLD

Historically, the term epigenetics was introduced by Conrad Waddington in 1940. It was defined as the branch of biology that studies the causal interactions between genes and their products that originate the phenotype. Nowadays, epigenetic phenomena are defined as changes in hereditary gene expression through mitosis and/or meiosis, caused by an adaptive mechanism that is not related to alterations of the primary DNA sequence [43]. These mechanisms are considered reversible, since they are modulated by environmental stimuli, and their imbalance can lead to the development of a wide spectrum of disorders of varying severity.

3.1. Histone Modifications

Modifications of the histones amino-terminal ends are key factors in the maintenance of chromatin structure and gene expression. It has been described that aberrant histone modifications promote the development of insulin resistance and, consequently, NAFLD [44]. Among the main modifications are acetylations, related to the activation of gene transcription and catalyzed by histone acetyltransferases (HAT), and deacetylations, involved in repression of genes and catalyzed by histone deacetylases

(HDAC). Up to date, the greatest findings have been described in mice. The imbalance between both enzymes seems to influence the phenotypic gene expression in NAFLD, resulting in liver damage [45].

Zhang et al. [46] have defined CREBH to be a stress-inducible transcriptional activator that is critically involved in inflammation and metabolism. Metabolic stress and acute liver injuries can induce CREBH cleavage, mediated by the site 1 protease (SP1) and site 2 protease (SP2), the same enzymes that process sterol regulatory element binding proteins upon the demands of lipid or sterol biosynthesis [47]. The cleaved N-terminal fragment of CREBH enters into the nucleus and acts as a potent transcription factor that activates the expression of genes involved in the hepatic acute-phase response, gluconeogenesis, lipogenesis, fatty acids (FA) oxidation, and lipolysis [48]. Modulation of CREBH acetylation can significantly affect CREBH transcriptional activity and lead to the altered lipid homeostasis associated with hepatic steatosis and hyperlipidemia [49]. The deacetylase sirtuin-1 (SIRT1) is known to mediate the nutritional and hormonal modulation of hepatic energy metabolism through the deacetylation of metabolic regulators. The activation of SIRT1 shows potential against the physiological mechanisms related to NAFLD, and its plasma levels have been found to be increased in obese patients with NAFLD [50]. The beneficial effect of SIRT1 activation observed in experimental models of NAFLD has been linked to modulation of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) activity and fatty acid oxidation [51] more than to chromatin remodeling. Therefore, SIRT1 could play a dual role, on the one hand as a potential therapeutic target and also as a non-invasive biomarker of NAFLD.

3.2. DNA Methylation

DNA methylation is the addition of a methyl group to a cytosine with guanine as the next nucleotide (CpG islands). DNA methylation plays a central role in the regulation of gene expression, representing a level of epigenetic regulation commonly associated with transcriptional repression and chromatin accessibility. Aberrant patterns of DNA methylation affect cellular homeostasis, such as hypermethylation, associated with gene repression, and hypomethylation, related to gene activation. Many methylations take place in the liver, so that hepatic steatosis is commonly seen from the point of view of the deregulation of carbon metabolism, being related to folate deficiency [52]. In mice, the onset of steatosis is accompanied by alterations in the expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in the liver [53]. In humans, hepatic DNMT levels have been found to be increased in patients with steatohepatitis versus those with simple steatosis, and in addition to being significantly associated with the NAS Score [54].

Abnormal DNA methylation seems to be the starting point for carcinogenesis, especially in NAFLD-related hepatocellular carcinoma [55]. Metabolites derived from the metabolic syndrome, such as insulin, glucose or lipids, could disrupt gene regulation at the epigenetic level, leading the body to a pro-inflammatory state disrupting metabolic pathways [56]. In addition, DNA methylation can be remodeled by transcriptional factors. They have been evaluated after bariatric surgery and the massive weight loss that it entails, suggesting that changes in methylation associated with NAFLD may be partially reversible [57,58]. Differential methylation may contribute to significant differences in gene expression; 69,247 CpG sites with a different methylation pattern (78% hypomethylated, 24% hypermethylated) have been described in liver tissue of 100 patients with different stages of disease [59,60]. It has been shown in humans diagnosed with NAFLD that PPARs are hyper-methylated and fibrogenic TGF- β 1 and PDGF- α are hypo-methylated in patients with progressive disease [61]. Moreover, preliminary evidence suggests that circulating cell-free DNA reflects PPAR γ methylation status in the liver, representing a potential non-invasive biomarker of liver damage [62].

3.3. MicroRNAs

MicroRNAs are a class of single chain small non-coding RNA molecules that act as regulators of gene expression and participate in translation of proteins. They can interfere with every aspect of cellular activity, such as differentiation and development, proliferation, metabolism, apoptosis

and carcinogenesis [63]. These molecules are receiving increasing attention since they are commonly deregulated in pathological situations, and are currently the most intensely studied epigenetic factors in NAFLD.

The targets of microRNA can be multiple genes (multiplicity), or multiple microRNAs can target a single gene (cooperativity). In addition, considering their potential in carcinogenesis, microRNAs can be categorized as oncogenes or onco-microRNAs or as tumor suppressor genes [64]. miRNAs stability has been demonstrated in serum, plasma, saliva and urine. The microRNAs circulate protected from the degradation of RNases contained in body fluids, and are currently being widely studied for the non-invasive diagnosis of a series of liver diseases, including NAFLD [65]. These findings suggest that aberrant expression of miRNAs may have mechanistic significance in NASH-associated liver carcinogenesis and may serve as an indicator for the development of NASH-derived HCC. An overview of the role of miRNAs in NAFLD progression in humans is given in Table 2.

Table 2. Association of specific miRNAs with NAFLD development and progression in humans.

miRNA	Pathway	Reference
miR-122	Lipid metabolism, carcinogenesis	[65]
miR-192	NAFLD progression	[66]
miR-34a, miR-16	Lipid metabolism	[67]
miR-21, miR-34a	Lipid metabolism	[68]
miR-1290, miR-27b-3p and miR-192-5p	Several (panel)	[64]
miR-301a-3p, miR-34a-5p and miR-375	Several (biomarkers)	[69]
miR-182	Fibrogenesis	[70]
miR-155	Inflammatory pathway and liver injury	[71]

Actually, the greatest importance of microRNAs in NAFLD lies in its potential to discriminate steatohepatitis and the diagnosis of hepatocarcinoma. In this sense, miR-122, the most expressed microRNA in human liver, is inhibited in steatohepatitis [72], acting as a suppressor of tumors in the liver. Silencing of miR-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from NASH, and miR-122 could be a novel molecular marker for evaluating the risk of HCC in patients with NASH [73]. It has been also proposed as a potential therapeutic target in the treatment of hypercholesterolemia and other dyslipidemias [66].

Besides miR-122, others miRNAs have been identified to be involved in NAFLD progression: Pirola et al. identified significant fold differences in serum levels of miR-192 (4.4-fold change in NASH vs. controls) [67]; Cermelli et al. identified increased serum levels of miR-34a and miR-16 in NAFLD patients compared to controls [68]; Yamada et al. identified in a cohort of NAFLD-diagnosed patients increased serum abundance of miR-21, miR-34a and miR-451 relative to controls [69]; Tan et al. identified miR-1290, miR-27b-3p and miR-192-5p as a panel of high diagnostic accuracy for NAFLD [65]; Guo et al. reported three miRNAs (miR-301a-3p, miR-34a-5p and miR-375) as potential biomarkers to access the severity of NAFLD [74]. Recently, it has been proposed that maintaining miR-155 expression in inflammatory cells might be a potential strategy to modulate liver injury [71].

There are still some barriers to the therapeutic use of miRNAs, due to their degradation by endogenous RNases. In addition, they affect several routes in different organs, so one still has to treat them with caution to avoid possible unwanted side effects. However, by characterizing the dysregulated miRNAs in the circulation, we might be able to identify key signaling pathways involved in the pathogenesis of the disease and also identify individuals at risk through miRNA profiling.

4. Concluding Remarks

Genetics and epigenetics play a key role in the development of several diseases, including NAFLD. New genetic determinants of NAFLD will continue to appear in the coming years, where future strategies should increase the number of individuals included in GWAS. Moreover, epigenetic changes

interact with inherited risk factors to determine an individual's susceptibility to NAFLD. To date, there is no approved pharmacologic therapy for NAFLD and the current treatment remains lifestyle modification with dieting and exercise aiming at weight loss. Therapeutic approaches involve potential modulation of the activity of enzymes responsible for DNA and protein epigenetic modifications. On the other hand, gene expression regulation is also provided by non-coding RNAs (miRNAs). The evaluation of circulating miRNA profiles represents a promising approach to assess and non-invasively monitor liver disease severity, although this issue still requires independent validations.

Acknowledgments: This work has been supported by grants #PI0892-2012, from the Andalusian Government; and Instituto de Salud Carlos III, PI14/01349 co-funded by European Union (ERDF/ESF, "Investing in your future"). J.A. Del Campo supported by Nicolás Monardes Program from Servicio Andaluz de Salud (SAS).

Author Contributions: José A Del Campo, Rocío Gallego-Durán, Paloma Gallego and Lourdes Grande wrote the manuscript and performed bibliographic research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ludwig, J.; Viggiano, T.R.; McGill, D.B.; Oh, B.J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* **1980**, *55*, 434–438. [[PubMed](#)]
2. Italian Association for the Study of the Liver (AISF). AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Dig. Liver Dis.* **2017**, *49*, 471–483.
3. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Diehl, A.M.; Brunt, E.M.; Cusi, K.; Charlton, M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **2012**, *55*, 2005–2023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Musso, G.; Gambino, R.; Cassader, M.; Pagano, G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann. Med.* **2011**, *43*, 617–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Piscaglia, F.; Svegliati-Baroni, G.; Barchetti, A.; Pecorelli, A.; Marinelli, S.; Tiribelli, C.; Bellentani, S. HCC-NAFLD Italian Study Group. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology* **2016**, *63*, 827–838.
6. Farrell, G.C.; van Rooyen, D.; Gan, L.; Chitturi, S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* **2012**, *6*, 149–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Targher, G.; Byrne, C.D.; Lonardo, A.; Zoppini, G.; Barbui, C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 589–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kim, J.; Lee, D.Y.; Park, S.E.; Park, C.-Y.; Lee, W.-Y.; Oh, K.-W.; Park, S.-W.; Rhee, E.-J. Increased risk for development of coronary artery calcification in subjects with non-alcoholic fatty liver disease and systemic inflammation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Sinn, D.H.; Kang, D.; Chang, Y.; Ryu, S.; Gu, S.; Kim, H.; Seong, D.; Cho, S.J.; Yi, B.-K.; Park, H.-D.; et al. Non-alcoholic fatty liver disease and progression of coronary artery calcium score: A retrospective cohort study. *Gut* **2017**, *66*, 323–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Vernon, G.; Baranova, A.; Younossi, Z.M. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 274–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Study Group; Lonardo, A.; Bellentani, S.; Argo, C.K.; Ballestri, S.; Byrne, C.D.; Caldwell, S.H.; Cortez-Pinto, H.; Grieco, A.; Machado, M.V.; et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig. Liver Dis.* **2015**, *47*, 997–1006.
12. Cordero, P.; Campion, J.; Milagro, F.I.; Martinez, J.A. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: Effect of dietary methyl donor supplementation. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *110*, 388–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Targher, G.; Lonardo, A.; Byrne, C.D. Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *14*, 99–114. [[PubMed](#)]

14. Colak, Y.; Yesil, A.; Mutlu, H.H.; Caklili, O.T.; Ulasoglu, C.; Senates, E.; Takir, M.; Kostek, O.; Yilmaz, Y.; Yilmaz Enc, F.; et al. A potential treatment of non-alcoholic fatty liver disease with SIRT1 activators. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **2014**, *23*, 311–319. [\[PubMed\]](#)
15. Rinella, M.E. Nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review. *JAMA* **2015**, *313*, 2263–2273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Wong, V.W.-S.; Chitturi, S.; Wong, G.L.-H.; Yu, J.; Chan, H.L.-Y.; Farrell, G.C. Pathogenesis and novel treatment options for non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *1*, 56–67. [\[CrossRef\]](#)
17. Piccinino, F.; Sagnelli, E.; Pasquale, G.; Giusti, G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J. Hepatol.* **1986**, *2*, 165–173. [\[CrossRef\]](#)
18. Romero-Gómez, M.; Zelber-Sagi, S.; Trenell, M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 829–846.
19. Townsend, S.A.; Newsome, P.N. Review article: New treatments in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 494–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Romeo, S.; Kozlitina, J.; Xing, C.; Pertsemlidis, A.; Cox, D.; Pennacchio, L.A.; Boerwinkle, E.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1461–1465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Anstee, Q.M.; Day, C.P. The genetics of NAFLD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 645–655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Sookoian, S.; Castaño, G.O.; Burgueño, A.L.; Gianotti, T.F.; Rosselli, M.S.; Pirola, C.J. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 2111–2116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Xu, J.; Xin, Y.; Lü, W.; Lin, Z.; Zhang, D.; Zhang, M.; Dong, Q.; Jiang, X.; Xuan, S. Polymorphism rs738409 in PNPLA3 is associated with inherited susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **2013**, *21*, 619–623. [\[PubMed\]](#)
24. Zhang, L.; You, W.; Zhang, H.; Peng, R.; Zhu, Q.; Yao, A.; Li, X.; Zhou, Y.; Wang, X.; Pu, L.; et al. PNPLA3 polymorphisms (rs738409) and non-alcoholic fatty liver disease risk and related phenotypes: A meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 821–829. [\[CrossRef\]](#)
25. Liu, Y.-L.; Patman, G.L.; Leathart, J.B.S.; Piguat, A.-C.; Burt, A.D.; Dufour, J.-F.; Day, C.P.; Daly, A.K.; Reeves, H.L.; Anstee, Q.M. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 75–81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Valenti, L.; Motta, B.M.; Soardo, G.; Iavarone, M.; Donati, B.; Sangiovanni, A.; Carnelutti, A.; Dongiovanni, P.; Rametta, R.; Bertelli, C.; et al. PNPLA3 I148M Polymorphism, Clinical Presentation, and Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75982. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Hyysalo, J.; Stojkovic, I.; Kotronen, A.; Hakkarainen, A.; Sebastianova, K.; Makkonen, J.; Lundbom, N.; Rissanen, A.; Krauss, R.M.; Melander, O.; et al. Genetic variation in PNPLA3 but not APOC3 influences liver fat in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27*, 951–956. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Pirazzi, C.; Adiels, M.; Burza, M.A.; Mancina, R.M.; Levin, M.; Ståhlman, M.; Taskinen, M.-R.; Orho-Melander, M.; Perman, J.; Pujia, A.; et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 1276–1282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. He, S.; McPhaul, C.; Li, J.Z.; Garuti, R.; Kinch, L.; Grishin, N.V.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. A Sequence Variation (I148M) in PNPLA3 Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Disrupts Triglyceride Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 6706–6715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Winberg, M.E.; Khalaj Motlagh, M.; Stenkula, K.G.; Holm, C.; Jones, H.A. Adiponutrin: A multimeric plasma protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 1114–1119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. BasuRay, S.; Smagris, E.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology* **2017**, *66*, 1111–1124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Chamorro, A.-J.; Torres, J.-L.; Mirón-Canelo, J.-A.; González-Sarmiento, R.; Laso, F.-J.; Marcos, M. Systematic review with meta-analysis: The I148M variant of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene (PNPLA3) is significantly associated with alcoholic liver cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2014**, *40*, 571–581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Sagnelli, C.; Merli, M.; Uberti-Foppa, C.; Hasson, H.; Cirillo, G.; Grandone, A.; Salpietro, S.; Minichini, C.; Del Giudice, E.M.; Lazzarin, A.; et al. Impact of PNPLA3 variants on liver histology of 168 patients with HIV infection and chronic hepatitis C. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 372–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shen, J.; Wong, G.L.-H.; Chan, H.L.-Y.; Chan, R.S.-M.; Chan, H.-Y.; Chu, W.C.-W.; Cheung, B.H.-K.; Yeung, D.K.-W.; Li, L.S.; Sea, M.M.-M.; et al. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mancina, R.M.; Dongiovanni, P.; Petta, S.; Pingitore, P.; Meroni, M.; Rametta, R.; Borén, J.; Montalcini, T.; Pujia, A.; Wiklund, O.; et al. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1219–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Donati, B.; Dongiovanni, P.; Romeo, S.; Meroni, M.; McCain, M.; Miele, L.; Petta, S.; Maier, S.; Rosso, C.; De Luca, L.; et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kozlitina, J.; Smagris, E.; Stender, S.; Nordestgaard, B.G.; Zhou, H.H.; Tybjærg-Hansen, A.; Vogt, T.F.; Hobbs, H.H.; Cohen, J.C. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 352–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mahdessian, H.; Taxiarchis, A.; Popov, S.; Silveira, A.; Franco-Cereceda, A.; Hamsten, A.; riksson, P.; van't Hooft, F. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8913–8918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Dongiovanni, P.; Petta, S.; Maglio, C.; Fracanzani, A.L.; Pipitone, R.; Mozzi, E.; Motta, B.M.; Kaminska, D.; Rametta, R.; Grimaudo, S.; et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* **2015**, *61*, 506–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Petta, S.; Miele, L.; Bugianesi, E.; Cammà, C.; Rosso, C.; Boccia, S.; Cabibi, D.; Di Marco, V.; Grimaudo, S.; Grieco, A.; et al. Glucokinase Regulatory Protein Gene Polymorphism Affects Liver Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Eslam, M.; Hashem, A.M.; Leung, R.; Romero-Gomez, M.; Berg, T.; Dore, G.J.; Chan, H.L.K.; Irving, W.L.; Sheridan, D.; Abate, M.L.; et al. International Hepatitis C Genetics Consortium (IHCGC) Interferon- λ rs12979860 genotype and liver fibrosis in viral and non-viral chronic liver disease. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Petta, S.; Valenti, L.; Tuttolomondo, A.; Dongiovanni, P.; Pipitone, R.M.; Cammà, C.; Cabibi, D.; Di Marco, V.; Fracanzani, A.L.; Badiali, S.; Nobili, V.; et al. Interferon lambda 4 rs368234815 TT> δ G variant is associated with liver damage in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2017**, *66*, 1885–1893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Portela, A.; Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1057–1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ling, C.; Groop, L. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* **2009**, *58*, 2718–2725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lee, J.; Friso, S.; Choi, S.-W. Epigenetic Mechanisms Underlying the Link between Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases and Nutrition. *Nutrients* **2014**, *6*, 3303–3325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhang, C.; Wang, G.; Zheng, Z.; Maddipati, K.R.; Zhang, X.; Dyson, G.; Williams, P.; Duncan, S.A.; Kaufman, R.J.; Zhang, K. Endoplasmic reticulum-tethered transcription factor cAMP responsive element-binding protein, hepatocyte specific, regulates hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation, and lipolysis upon metabolic stress in mice. *Hepatology* **2012**, *55*, 1070–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhang, K.; Shen, X.; Wu, J.; Sakaki, K.; Saunders, T.; Rutkowski, D.T.; Back, S.H.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress Activates Cleavage of CREBH to Induce a Systemic Inflammatory Response. *Cell* **2006**, *124*, 587–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lee, M.-W.; Chanda, D.; Yang, J.; Oh, H.; Kim, S.S.; Yoon, Y.-S.; Hong, S.; Park, K.-G.; Lee, I.-K.; Choi, C.S.; et al. Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. *Cell Metab.* **2010**, *11*, 331–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kim, H.; Mendez, R.; Chen, X.; Fang, D.; Zhang, K. Lysine Acetylation of CREBH Regulates Fasting-Induced Hepatic Lipid Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 4121–4134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. Mariani, S.; Fiore, D.; Basciani, S.; Persichetti, A.; Contini, S.; Lubrano, C.; Salvatori, L.; Lenzi, A.; Gnessi, L. Plasma levels of SIRT1 associate with non-alcoholic fatty liver disease in obese patients. *Endocrine* **2015**, *49*, 711–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Mukhopadhyay, P.; Horváth, B.; Rajesh, M.; Varga, Z.V.; Gariani, K.; Ryu, D.; Cao, Z.; Holovac, E.; Park, O.; Zhou, Z.; et al. PARP inhibition protects against alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, 589–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Barnett, M.P.G.; Bermingham, E.N.; Young, W.; Bassett, S.A.; Hesketh, J.E.; Maciel-Dominguez, A.; McNabb, W.C.; Roy, N.C. Low folate and selenium in the mouse maternal diet alters liver gene expression patterns in the offspring after weaning. *Nutrients* **2015**, *7*, 3370–3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Pogribny, I.P.; Tryndyak, V.P.; Bagnyukova, T.V.; Melnyk, S.; Montgomery, B.; Ross, S.A.; Latendresse, J.R.; Rusyn, I.; Beland, F.A. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J. Hepatol.* **2009**, *51*, 176–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pirola, C.J.; Gianotti, T.F.; Burgueño, A.L.; Rey-Funes, M.; Loidl, C.F.; Mallardi, P.; Martino, J.S.; Castaño, G.O.; Sookoian, S. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut* **2013**, *62*, 1356–1363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Xu, R.; Wei, W.; Krawczyk, M.; Wang, W.; Luo, H.; Flagg, K.; Yi, S.; Shi, W.; Quan, Q.; Li, K.; et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1155–1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tian, Y.; Wong, V.W.-S.; Chan, H.L.-Y.; Cheng, A.S.-L. Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Semin. Cancer Biol.* **2013**, *23*, 471–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ahrens, M.; Ammerpohl, O.; von Schönfels, W.; Kolarova, J.; Bens, S.; Itzel, T.; Teufel, A.; Herrmann, A.; Brosch, M.; Hinrichsen, H.; et al. DNA Methylation Analysis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Distinct Disease-Specific and Remodeling Signatures after Bariatric Surgery. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 296–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Benton, M.C.; Johnstone, A.; Eccles, D.; Harmon, B.; Hayes, M.T.; Lea, R.A.; Griffiths, L.; Hoffman, E.P.; Stubbs, R.S.; Macartney-Coxson, D. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Murphy, S.K.; Yang, H.; Moylan, C.A.; Pang, H.; Dellinger, A.; Abdelmalek, M.F.; Garrett, M.E.; Ashley-Koch, A.; Suzuki, A.; Tillmann, H.L.; et al. Relationship Between Methylome and Transcriptome in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 1076–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Teufel, A.; Itzel, T.; Erhart, W.; Brosch, M.; Wang, X.Y.; Kim, Y.O.; von Schönfels, W.; Herrmann, A.; Brückner, S.; Stickel, F.; et al. Comparison of Gene Expression Patterns between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues from Patients. *Gastroenterology* **2016**, *151*, 513–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Zeybel, M.; Hardy, T.; Robinson, S.M.; Fox, C.; Anstee, Q.M.; Ness, T.; Masson, S.; Mathers, J.C.; French, J.; White, S.; et al. Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clin. Epigenetics* **2015**, *7*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hardy, T.; Zeybel, M.; Day, C.P.; Dipper, C.; Masson, S.; McPherson, S.; Henderson, E.; Tiniakos, D.; White, S.; French, J.; et al. Plasma DNA methylation: A potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* **2017**, *66*, 1321–1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Giordano, S.; Columbano, A. MicroRNAs: New tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? *Hepatology* **2013**, *57*, 840–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. De Conti, A.; Festa Ortega, J.; Tryndyak, V.; Dreval, K.; Salvador Moreno, F.; Rusyn, I.; Beland, F.A.; Pogribny, I.P. MicroRNA deregulation in nonalcoholic steatohepatitis-associated liver carcinogenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 88517–88528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Tan, Y.; Ge, G.; Pan, T.; Wen, D.; Gan, J. A Pilot Study of Serum MicroRNAs Panel as Potential Biomarkers for Diagnosis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sacco, J.; Adeli, K. MicroRNAs. *Curr. Opin. Lipidol.* **2012**, *23*, 220–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Pirola, C.J.; Fernández, T.; Gianotti, T.; Castaño, G.O.; Mallardi, P.; San Martino, J.; Mora Gonzalez Lopez Ledesma, M.; Flichman, D.; Mirshahi, F.; Sanyal, A.J.; Sookoian, S. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: From serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* **2015**, *64*, 800–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]


68. Cermelli, S.; Ruggieri, A.; Marrero, J.A.; Ioannou, G.N.; Beretta, L. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Yamada, H.; Suzuki, K.; Ichino, N.; Ando, Y.; Sawada, A.; Osakabe, K.; Sugimoto, K.; Ohashi, K.; Teradaira, R.; Inoue, T.; et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *424*, 99–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Liu, X.-L.; Pan, Q.; Zhang, R.-N.; Shen, F.; Yan, S.-Y.; Sun, C.; Xu, Z.-J.; Chen, Y.-W.; Fan, J.-G. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 9844–9852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Blaya, D.; Aguilar-Bravo, B.; Hao, F.; Casacuberta-Serra, S.; Coll, M.; Perea, L.; Vallverdú, J.; Graupera, I.; Pose, E.; Llovet, L.; et al. Expression of microRNA-155 in inflammatory cells modulates liver injury. *Hepatology* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Cheung, O.; Puri, P.; Eicken, C.; Contos, M.J.; Mirshahi, F.; Maher, J.W.; Kellum, J.M.; Min, H.; Luketic, V.A.; Sanyal, A.J. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* **2008**, *48*, 1810–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Takaki, Y.; Saito, Y.; Takasugi, A.; Toshimitsu, K.; Yamada, S.; Muramatsu, T.; Kimura, M.; Sugiyama, K.; Suzuki, H.; Arai, E.; et al. Silencing of *microRNA-122* is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 1254–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Guo, Y.; Xiong, Y.; Sheng, Q.; Zhao, S.; Wattacheril, J.; Flynn, C.R. A micro-RNA expression signature for human NAFLD progression. *J. Gastroenterol.* **2016**, *51*, 1022–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by sorafenib in liver cancer cells

María A. Rodríguez-Hernández^{1*} | Raúl González^{1*} | Ángel J. de la Rosa¹ | Paloma Gallego^{2†} | Raquel Ordóñez^{3,4†} | Elena Navarro-Villarán^{1†} | Laura Contreras^{1,5†} | Mario Rodríguez-Arribas^{6,7} | Javier González-Gallego^{3,4} | José M. Álamo-Martínez^{1,4,8} | Luís M. Marín-Gómez^{1,8} | José A. Del Campo^{2,4} | José L. Quiles⁹ | José M. Fuentes^{6,7} | Jesús de la Cruz^{1,5} | José L. Mauriz^{3,4} | Francisco J. Padillo^{1,4,8} | Jordi Muntané^{1,4,8} 

¹Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), Hospital University "Virgen del Rocío"/CSIC/University of Seville, Seville, Spain

²Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases, Hospital University "Nuestra Señora de Valme", Seville, Spain

³Institute of Biomedicine (IBIOMED), Department of Biomedical Sciences, University of León, León, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain

⁵Department of Genetics, University of Seville, Seville, Spain

⁶Department of Biochemistry, Molecular Biology and Genetics, Faculty of Nursery and Occupational Therapy, University of Extremadura, Cáceres, Spain

⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

⁸Department of General Surgery, Hospital University "Virgen del Rocío"/CSIC/University of Seville/IBiS/CSIC/University of Seville, Spain

⁹Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix Verdú", Biomedical Research Center, Department of Physiology, University of Granada, Granada, Spain

Correspondence

Jordi Muntané, PhD, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), IBiS/"Virgen del Rocío" University Hospital/CSIC/University of Seville, Seville, Spain, Av. Manuel Siurot s/n, 41013-Seville, Spain.
Email: jmuntane-ibis@us.es

Funding information

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Grant/Award Number: BFU2016-75352-P; Institute of Health Carlos III, Grant/Award Numbers: PI15/00034, PI13/00021, PI16/00090, PI14/01349; Ministry of Education, Grant/Award Numbers: FPU16/05127, FPU12/01433, FPU13/01237; Andalusian Government, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Grant/Award Number: CTS-6264; Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales, Grant/Award Numbers: PI-00025-2013, PI-0127-2013, PI-0198-2016; Ministry of Health, Grant/Award Numbers: PI13/00021, PI14/01349, PI15/00034, PI16/00090

Sorafenib is the unique accepted molecular targeted drug for the treatment of patients in advanced stage of hepatocellular carcinoma. The current study evaluated cell signaling regulation of endoplasmic reticulum (ER) stress, c-Jun-N-terminal kinase (JNK), Akt, and 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) leading to autophagy and apoptosis induced by sorafenib. Sorafenib induced early (3–12 hr) ER stress characterized by an increase of ^{Ser51}P-eIF2 α /eIF2 α , C/EBP homologous protein (CHOP), IRE1 α , and sXBP1, but a decrease of activating transcription factor 6 expression, overall temporally associated with the increase of ^{Thr183,Tyr185}P-JNK1/2/JNK1/2, ^{Thr172}P-AMPK α , ^{Ser413}P-Foxo3a, ^{Thr308}P-Akt/Akt and ^{Thr32}P-Foxo3a/Foxo3a ratios, and reduction of ^{Ser2481}P-mammalian target of rapamycin (mTOR)/mTOR and protein translation. This pattern was related to a transient increase of tBid, Bim_{EL}, Beclin-1, Bcl-xL, Bcl-2, autophagy markers, and reduction of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) expression. The progressive increase of CHOP expression, and reduction of ^{Thr308}P-Akt/Akt and ^{Ser473}P-Akt/Akt ratios were associated with the reduction of autophagic flux and an additional upregulation of Bim_{EL} expression and caspase-3 activity (24 hr). Small interfering-RNA (si-RNA) assays showed that Bim, but not Bak and Bax, was involved in the induction of caspase-3 in sorafenib-treated HepG2 cells.

*María A. Rodríguez-Hernández and Raúl González Contreras contributed equally to this work.

†Paloma Gallego, Raquel Ordóñez, Elena Navarro-Villarán and Laura Contreras contributed equally to this work.

Sorafenib increased autophagic and apoptotic markers in tumor-derived xenograft model. In conclusion, the early sorafenib-induced ER stress and regulation of JNK and AMPK-dependent signaling were related to the induction of survival autophagic process. The sustained drug treatment induced a progressive increase of ER stress and PERK-CHOP-dependent rise of Bim_{EL}, which was associated with the shift from autophagy to apoptosis. The kinetic of Bim_{EL} expression profile might also be related to the tight balance between Akt- and AMPK-related signaling leading to Foxo3a-dependent BIM_{EL} upregulation.

KEYWORDS

5'AMP-activated protein kinase (AMPK), apoptosis, autophagy, Bcl-2, endoplasmic reticulum stress, mammalian target of rapamycin (mTOR)

1 | INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancer and the second most frequent cause of cancer-related death worldwide (Llovet et al., 2016; Torre et al., 2015). HCC develops within a cirrhotic liver in 80%–90% of cases that influences therapeutic decisions (Fattovich, Stroffolini, Zagni, & Donato, 2004; Sanyal, Yoon, & Lencioni, 2010). The difficulty in forming an early diagnosis, at the first stage of the disease, contributes to the poor response of patients to current clinical treatments. Currently, only one-third of newly diagnosed patients with HCC are at an early stage (0 or A), according to the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system, and are eligible for potential curative therapies such as local ablation, resection, or orthotopic liver transplantation with a 5-year survival rate of 50%–80% (Bruix, Reig, & Sherman, 2016). The recommended first-line treatment for patients with locally advanced/metastatic disease (BCLC C) is sorafenib with a mean overall survival of 11 months (Cheng et al., 2009; Llovet et al., 2008).

Sorafenib inhibits tyrosine kinase receptors such as vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 2, VEGFR 3, platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β), Flt3 and c-Kit, as well as molecular components of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway (Cervello et al., 2012). Different studies have suggested that the increased susceptibility to cell death by sorafenib is associated with down-regulation of cell survival pathways in hepatoma cells (Prieto-Dominguez et al., 2016). In particular, Chen et al. (2010) showed that sorafenib enhanced TRAIL-induced cell death through SH2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1)-dependent reduction of signal transducers and activators of transcription type 3 (STAT3) phosphorylation (^{Tyr705}STAT3) and related proteins members myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), survivin, and cyclin D1 in hepatoma cells. Sorafenib-induced cell death is also related to upregulation of the proapoptotic “BH3-domain only” PUMA and BIM, as well as a decrease of Mcl-1 and survivin (Fernando et al., 2012). It has also been shown that c-Jun-N-terminal kinase (JNK)-dependent GADD45 β (Ou et al., 2010) and PUMA (Fernando et al., 2012) expressions are also involved in the proapoptotic properties of sorafenib in HCC cells. Shimizu et al. (2012) showed that sorafenib

enhanced autophagy, pharmacological inhibition due to which increased apoptosis and decreased cell viability in sorafenib-treated Huh7, HLF, and PLC/PRF/5 cells. However, other studies did not find a relationship between autophagy induction and resistance to treatment in sorafenib-treated HCC cells (Fischer, Wang, Vlada, Kim, & Behrns, 2014). The current study showed that the induction of autophagy in sorafenib-treated HepG2 cells is related to IRE-1 and eIF2 α -dependent ER stress, JNK and 5'AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent signaling. The shift from autophagy to apoptosis is related to a decline of Beclin-1, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2, and tBid and the increase of proapoptotic Bim_{EL}, Bak, and Bax.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Chemical and reagents

Sorafenib (Ref FS10808; Carbosynth Limited, Berkshire, UK) was dissolved in dimethyl sulfoxide as stock solution (100 mM). 3-Methyladenine (3MA; Ref M9281), chloroquine (CQ; Ref C6628), SP600125 (Ref S5567), and dorsomorphin (Ref P5499) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

2.2 | Primary human hepatocytes, cell lines, and culture conditions

Human hepatocytes were prepared from liver biopsies obtained from three patients (two females and one male, aged 66 \pm 3.0 years) submitted to surgical resection for liver tumors after obtaining the patients' written consent. Hepatocytes isolation was based on a two-step collagenase procedure (Pichard et al., 2006). HepG2 and Hep3B cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (LGC Standards, S.L. U., Barcelona, Spain). Huh7 cell line was purchased from Apath, LLC (Brooklyn, NY). Cell lines were selected according to their p53 content: HepG2 (WT p53 expression), Huh7 (p53 mutated isoform, codon 220), and Hep3b (nonsense p53 mutation). All lines were negative for mycoplasma contamination. The cells were cultured in minimum essential medium (MEM) with Earle's salts with L-glutamine (Ref E15–825, PAA) with 10% fetal bovine serum (FBS; F7524, Sigma-Aldrich, Lot No:

022M3395, endotoxin < 0.2 EU/ml), sodium pyruvate (1 mM; Ref S11-003, PAA), nonessential amino acids (Ref M11-003, PAA), penicillin-streptomycin solution (100 U/ml–100 µg/ml; P11-010, PAA), at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. The cells were cultured at a cell density of 100,000 cells/cm², treatment added 24 after plating, and lysates were obtained at different time points after treatments. Sorafenib was administrated at different concentrations (1 nM–100 µM). Additional experimental interventions, such as 3MA (5 µM) and CQ (50 µM), were preadministered (2 hr), and dorsomorphin (5 µM) was coadministered with sorafenib. The Biobank of the Institution approved the use of primary biopsies of patients for the present research (Ref. no 33140031, April 1, 2014).

2.3 | Effect of sorafenib administration on tumor growth in a xenograft mouse model

Sixty male Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} mice (Harlan Laboratories, Barcelona, Spain), aged 4 weeks (weighing 18–22 g), were randomly distributed in three groups according to the subcutaneous implantation of HepG2, Hep3b, and Huh7. Cells (10 × 10⁶) were diluted in matrigel (Ref 356231, Lot 36821, Becton-Dickinson, NJ) and administered subcutaneously into the right flank of the mice. Each experimental group was subdivided into the group receiving sorafenib (200 mg/kg) and the group receiving a solvent, which was constituted by ethanol:Koliphor EL (C5135, Sigma-Aldrich):0.9% NaCl (1:1:6). Sorafenib or solvent was administered daily by oral gavage when the tumor diameter grew to 5 mm (11 days) and ended at the sacrifice of animals when tumor diameter was 15 mm (24 days). The tumor volume was calculated using the formula: $V = [(length) \times (width) \times (depth) \times \pi] / 6$. All animal care and experimentation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Academy of Sciences. The Ethical Committee of the Institution approved the *in vivo* experiments (Ref. no CEP2104 PI/016, January 30, 2014).

2.4 | Immunohistochemistry

Tumor tissue sections (5 µm) were obtained to analyze the expression of α -smooth muscle actin (α -sma), Ki67, CD31, and CD34 by immunohistochemistry. Sections were deparaffinized, hydrated through graded ethanol steps, briefly rinsed in water, and blocked at room temperature using TBSA-BSAT (10 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.02% sodium azide, 2% bovine serum albumin and 0.1% Triton-X100). Slices were incubated overnight at room temperature with primary antibodies against 1:250 α -sma (ab5694; Abcam, Cambridge, UK), 1:500 (Ki67, IR626; DAKO, Glostrup, Denmark), 1:500 CD31 (ab28364; Abcam), and 1:200 CD34 (ab64480; Abcam), followed by incubation with the corresponding secondary antibodies, either Alexa 488 anti-rabbit IgG (A11008; Invitrogen, Carlsbad, CA, Spain) or Alexa 488 anti-mouse IgG (A11001; Invitrogen), for 5 hr diluted in TBSA-BSAT (1:500). Nuclear staining was performed using DRAQ-5th (red fluorescent cell-permeable DNA probe; Biostatus Limited, Loughborough, UK). Immunofluorescence analysis was

performed using an Olympus BX61 microscope (Tokyo, Japan). Fluorescence quantification was performed using Leica Application Suite Advanced Fluorescence software and ImageJ software (Wetzlar, Germany).

2.5 | Ultrastructural analysis by transmission electronic microscopy

Treated and control cells were isolated and prefixed in 1.5% formaldehyde in 1% cacodylate buffer, pH 7.4, for 2 hr at 4°C. After three washes in cacodylate buffer, the extracts were fixed in 1% osmium tetroxide for 60 min at 0–4°C. The samples were dehydrated in graded ethanol and embedded in Epon resin. After overnight incubation at 65°C, ultrathin sections (70 nm) were cut with a diamond knife using an Ultracut S ultramicrotome and placed on 200-mesh copper grids. All sections were stained with uranyl acetate, counterstained with lead citrate, and viewed using a Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) EM10C electron microscope at 4,646×, 10,000×, and 46,460× magnifications in the Biomedical Research Center at the University of Granada's Health Technology Park.

2.6 | Measurement of cell death

Caspase-3-associated activities were determined using Caspase-Glo® 3 Assay Systems (G8091; Promega, Madison). Cells were treated with Caspase-Glo® 3 in an “add-mix-measure” format resulting in cell lysis, caspase-3-dependent cleavage of the substrate and generation of a “glow-type” luminescent signal. The signal generated was proportional to the amount of caspase activity. The values are extrapolated into a calibration curve included in the assay. Cell death in tissue sections was determined using the DeadEnd™ fluorometric terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) System (G3250, Promega) that measures the fragmented DNA of apoptotic cells by catalytically incorporating fluorescein-12-dUTP at 3'-OH DNA ends using the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), which forms a polymeric tail using the principle of the TUNEL assay. The fluorescein-12-dUTP-labeled DNA was visualized using an Olympus BX61 microscope. Fluorescence quantification was performed using Leica Application Suite Advanced Fluorescence software and the ImageJ software.

2.7 | Cell proliferation

The measurement of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation was used as marker of cell proliferation (Ref. 11647229001; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Cells were seeded in 96-well plates at low density (12,500 cells/cm²). Two hours before sampling, 20 µl of BrdU (10 µM) was added to the cultures. DNA was denaturalized with 200 µl FixDenat solution included in the commercial assay for 30 min at room temperature. After removal, the cells were incubated with 100 µl monoclonal anti-BrdU antibody HRP conjugated for 90 min at room temperature. Afterwards, the cells were washed with PBS and incubated with 100 µl reveling solution including hydrogen peroxide, luminol and

4-iodophenol for 15 min at room temperature. Absorbance was measured at 370 nm using an Infinite 200 PRO Microplate Reader (TECAN, Männedorf, Switzerland).

2.8 | Assessment of protein expression of ER stress, autophagy, and apoptosis markers

Cells or tumor tissues were treated with lysis solution including 50 mM HEPES pH. 7.5, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 150 mM NaCl, 1% NP-40, a commercial proteases inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM NaF, and 1 mM Na₃VO₄. Protein expression were determined by SDS-PAGE coupled to western-blot analysis. Proteins (50–100 µg) were separated by Any kD™ Criterion™ TGX Stain-Free™ Protein Gel, 18 well, 30 µl (#5678124; BioRad, Hercules, CA) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The system uses stain-free technology, which is a method that appears to be more reliable as a protein loading control than measurement of housekeeping proteins (Colella et al., 2012). The membranes were incubated with the corresponding commercial primary and secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase revealing protein content by Clarity™ Western ECL substrate (Ref 170-5061; BioRad) and analyzed in a ChemiDoc™ Touch Imaging System. Antibodies for western-blot, tBid (#2002), eIF2α (#5324), inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α, #3294), p62 (#5114), Ser⁵¹P-eIF2α (#9721), Ser²⁴⁸¹P-mammalian target of rapamycin (mTOR) (#2974), AMPK (#5832), Thr¹⁷²P-AMPK (#2525), Bcl-xL (#27625), Bcl-2 (#2872), Bax (#5023), Bak (#12105), Bim (#2933), FoxO3a (#2497), Ser⁴¹³P-FoxO3a (#8174), Thr³²P-FoxO3a (#9464), and cleaved PARP (#9542) were commercially obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA); activating transcription factor 6 (ATF6, ab122897) was purchased from Abcam; LC3 (PM036) was purchased from MBL International (Woburn, MA); Beclin-1 (sc-11427), GADD153/CHOP (sc-575) and AKT (sc-1618) were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas); Thr³⁰⁸P-AKT (SAB4504740), Ser⁴⁷³P-AKT (SAB4300042), JNK1/2 (SAB4200176), Thr^{183,Tyr185}P-JNK1/2 (J4644) and Mcl-1 (SAB4501843) were obtained from Sigma-Aldrich. The corresponding secondary antibodies anti-rabbit (sc-2004), anti-mouse (sc-2005) and anti-goat (sc-2768) IgG-HRP labeled were purchased from Santa Cruz. Densitometric analysis was performed using the software Image Lab 6.0 of BioRad.

2.9 | XBP1s/XBP1 mRNA expression ratio by qRT-PCR

RNA was isolated using TRIreagent (BIO-38033; Bioline Reagents Ltd., London, UK), and submitted to retrotranscription (iScript™ cDNA Synthesis Kit #1708891; BioRad) and amplification by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) (iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix #1725142; BioRad). RT-PCR was performed in ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with a QuantumStudio™ Real Time PCR Software. Reactions were performed in 96-well plates with an optical sealing tape (Thermo Fisher Scientific) in 25 µl total volume

containing SyberGreen Mix and the corresponding cDNA. Histone 3 (H3B3) was used as internal control in parallel for each run. The conditions for amplification were as follows: polymerase activation and a DNA denaturation step of 95°C for 40 s; 30 cycles of amplification composed of a denaturation step of 95°C for 20 s and annealing/extension+plate read at the optimized temperature of each couple of primers (54–60°C) for 60 s; and a final melt curve analysis of 95°C 15 s, 60°C 60 s and 95°C 15 s. All primers were designed using online Primer3 software Primer3input and purchased from Eurofins (Eurofins Genomics):

Primer	Sequence 5'-3'	Tm, °C
XBP1s Fw	CGG GTC TGC TGA GTC CGC AGC AG	69.6
XBP1 Fw	GCA GGT GCA GGC CCA GTT GTC AC	67.8
XBP1s Rv	CCC CAC TGA CAG AGA AAG GGA GG	66
XBP1 Rv	CCC CAC TGA CAG AGA AAG GGA GG	66

2.10 | si-RNA interference

HepG2 cells were seeded in 6-well plates the day before transfection to reach a confluency of 60% in 24 hr. Transfection was conducted with the siTran 1.0 Transfection Reagent (siTran™ si-RNA transfection; Origene, Rockville, MD) according to recommendations of the manufacturer. The si-RNA of IRE1α, pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), and ATF6 were synthesized by Origene. Their targeting sequences can be accessed from the Origene webpage with the references SR301457 (IRE1α, NM_001433), SR306267 (PERK, NM_004836), and SR307883 (ATF6, NM_007348). A nontargeting si-RNA (SR30004, Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control si-RNA Duplex) also purchased from Origene was used as negative control. Sorafenib was added 48 hr after transfection.

si-RNA for knock-down Bax (L-003308-01-0005), Bak (L-003305-00-0005), Bim (L-004385-00-0005), FoxO3a (L-003007-00-0005), and scramble (D-001810-10-05) were obtained from Dharmacon (Lafayette, CO) and used in HepG2 cells cultured at 20,000 cells/cm². si-RNA (25 nM) were mixed with the transfection reagent DharmaFECT1 (Ref T-2001-02) for 20 min at room temperature and transferred to culture medium without antibiotic/antimycotic solution and kept for 24 hr prior to treatment. Afterwards, transfected cells were maintained until the end of the experiment following the manufacturer's recommendations.

2.11 | pDest-LC3-GFP-mCherry transient transfection and detection of punctuate LC3-positive structures

Expression of pH-sensitive sensor constructed as a tandem fusion of mCherry and GFP to LC3B (pDest-LC3-GFP-mCherry) was used to monitor autophagy in HepG2 cells (kindly provided by Dr. Terje Johansen). The GFP tag is acid-sensitive, whereas the mCherry tag is acid-insensitive. Yellow merge punctate structures indicate autophagosomes which neutral pH allows both tags emit

fluorescent light resulting in a yellow staining. Subsequent fusion of autophagosomes with lysosomes results in red-positive acidic vacuoles, where the green fluorescence from GFP is lost. HepG2 cells were seeded in 24-well plates with coverslips at 2×10^5 cells/ml, and 500 μ l of antibiotic free medium per well. After 24 hr, the cells were transiently transfected with pDest-LC3-GFP-mCherry construct with Lipofectamine 2000 (Ref 11668027; Invitrogen), according to the manufacturer's protocol (2 μ l of Lipofectamine and 3 μ g of plasmid per well). The following day, the cells were treated with Earle's balanced salt solution (Sigma, E2888) and CQ (50 μ M) as negative and positive control, respectively. Sorafenib was administered at 10 μ M and 100 μ M. All these treatments lasted for 6, 12, or 24 hr. Once the treatments were finished, the medium was recovered, and the cells were washed with phosphate saline buffer (PBS1X). The cells were immediately fixed by using a 4% (w/v) paraformaldehyde solution in PBS1X for 30 min. Nuclei were stained with Hoechst 33342 and coverslips were mounted in slides with Fluoromount G (Invitrogen, 00-4958-02). Fluorescence images were obtained with an inverted microscope (IX-51, Olympus) provided with a DP-70 camera. Image analyses were performed using IFDOTMETER (Rodríguez-Arribas et al., 2016) and ImageJ. The quantifications of the number of mCherry positive, corresponding to red-positive acidic autophagolysosome vacuoles, and GFP+mCherry positive, corresponding to yellow-positive autophagosome, were both measured at 6, 12, and 24 hr.

2.12 | Assessment of protein translation

The protocol adapted for polysome preparation of HepG2 cells was the one we routinely employ for yeast cells (Kressler, de la Cruz, Rojo, & Linder, 1997). Briefly, HepG2 cells were grown to 80% confluency in 175 cm² dishes as described above. Normally, two dishes were used per condition assayed. Before harvesting the cells, 200 μ g/ml cycloheximide was added and incubated for 5 min at 37°C. Each dish was then placed on ice, the medium was collected, and the cultures washed twice with PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ containing 200 μ g/ml cycloheximide. Then, 600 μ l of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 200 μ g/ml cycloheximide, 200 μ g/ml heparin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% NP40) was added to one dish, cells were scraped, and transferred to the second dish. After scraping the cells corresponding to the second dish, the whole juice was transferred to a 1.5 ml-Eppendorf tube. The tubes were incubated at 4°C with gentle end-over-end rotation for 10 min and then centrifuged at 16,000g for 8 min at 4°C in a refrigerated microfuge. The corresponding supernatants were recovered, and the A₂₆₀ was measured using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). About 10 absorption units of A₂₆₀ were layered on top of 7%–50% (w/v) sucrose gradients prepared in 50 mM Tris-acetate, pH 7.5, 50 mM NH₄Cl, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT. The gradients were centrifuged at 260,110 g (39,000 rpm) in a Beckman SW41 rotor at 4°C for 2 hr 45 min. To dissociate the vacant 80S ribosomes, high-salt conditions were achieved by adding NaCl to a final concentration of 0.25 M in the gradients. Gradient analysis was

performed with an ISCO UA-6 system (Isco, Inc. Lincoln, NE) equipped to continuously monitor the A₂₅₄.

2.13 | Expression of Bim, Bak, and Bax in Beclin-1 immunoprecipitated fraction

A volume of the cell lysate (500 μ g protein) was mixed with immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, commercial proteases inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich), and 2 μ g of anti-Beclin-1 antibodies (sc-48341, Santa Cruz Biotechnology Inc.) at 4°C overnight. Afterward, protein G Sepharose (35 I; GE Healthcare) was added, agitated for 3 hr, and the washed resin was loaded onto a 10% SDS-PAGE electrophoresis gel. The expression of Bim, Bak, and Bax was assessed by western-blot analysis as described above. The immunoprecipitation using unspecific mouse IgG (sc-2025; Santa Cruz Biotechnology) and anti-Beclin-1 antibodies were run in parallel. The expression of Bim, Bak, and Bax has also been measured in cell lysate (50 μ g proteins).

2.14 | Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean of independent experiments ($n = 4$ –10). Data were compared using the analysis of variance with the least significant difference's test as post-hoc multiple comparison analysis (homogeneity of variances) or Games-Howell analysis (nonhomogeneity of variances). If Shapiro-Wilks's test showed nonnormal distribution of data, nonparametric Kruskal-Wallis coupled to U Man-Whitney posthoc analysis with Finner's correction was done. The level of significance was set at $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$. The groups significantly different ($p \leq 0.05$) were indicated with different letters.

3 | RESULTS

3.1 | Sorafenib administration reduced tumor cell growth in xenograft mouse model

The administration of sorafenib tosylate (30–100 mg/kg) orally once daily reduced growth and angiogenesis while promoting apoptosis in tumors developed by PLC/PRF/5 (Liu et al., 2006) and patient-derived cell lines (Huynh et al., 2009) subcutaneously implanted in severe combined immunodeficient mice. Sorafenib tosylate (200 mg/kg) was administered to nude mice once daily when the diameter of the tumors reached 5 mm. The weight of animals did not change with the treatment (Supporting Information Figure S1a). The administration of sorafenib reduced tumor volume (Figure 1a and Supporting Information Figure S1b) in parallel to an increase of caspase-3 activity (Figure 1b), cleaved PARP (Figure 1c) and autophagic markers (Beclin-1 and LC3II/LC3I; Figure 1d) in tissue homogenate from tumors derived after implantation of HepG2 cells in nude mice. The expression of p62 in tumors was not reduced in tumors from sorafenib-treated

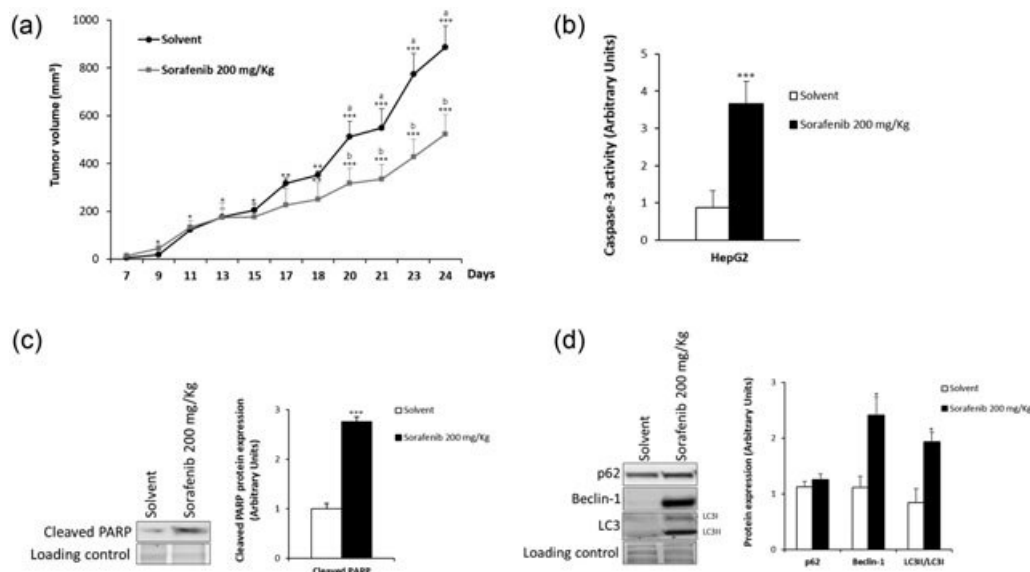


FIGURE 1 Effect of sorafenib on the tumor progression in the xenograft mouse model. HepG2 (10×10^6) were implanted at dorsal level in athymic mice and treatment was initiated when tumor reached 5 mm using oral administration of sorafenib (200 mg/kg) or solvent, being killed when one tumor size reached 15 mm of diameter. Sorafenib reduced tumor size (a), and increased caspase-3 activity (b), cleaved PARP (c), and autophagy markers (Beclin-1 and LC3II/LC3I) (d) in tumor homogenates. Protein expression was analyzed by western-blot. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots are representative of 10 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ between control and sorafenib treatment. The groups with different letters (a or b) were significantly different ($p \leq 0.05$)

animals (Figure 1d). Sorafenib also reduced the volume of tumors derived after implantation of Huh7 and Hep3B in nude mice (Supporting Information Figure S1b). Sorafenib increased apoptosis (TUNEL staining; Supporting Information Figure S1c) and reduced cell proliferation (Ki67; Supporting Information Figure S1d), fibrogenesis (α -SMA; Supporting Information Figure S1e), angiogenesis (CD31; Supplementary Figure S1f) and stemness (CD34; Supporting Information Figure S1g).

3.2 | Sorafenib reduced cell proliferation and increased apoptosis

Primary human hepatocytes were resistant to the proapoptotic properties of sorafenib (Figure 2a). However, the administration of sorafenib (10 μ M) increased caspase-3 in the three HCC cell lines tested

at 24 hr, with HepG2 being more susceptible than p53-deficient HCC cell lines (Hep3B and Huh7) to the treatment (Figure 2a). Differently, sorafenib moderately reduced cell proliferation in primary hepatocytes, whereas it drastically blocked cell proliferation in HCC cell lines with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) close to 10 μ M (Figure 2b; 24 hr).

3.3 | Induction of endoplasmic reticulum stress by sorafenib

The ER is responsible for the regulation of protein folding and cellular calcium concentrations through three ER transmembrane proteins: PERK, ATF6, and IRE1 (Fribley, Zhang, & Kaufman, 2009; Szegezdi, Logue, Gorman, & Samali, 2006). Shi et al. (2011) have reported that sorafenib (20 μ M) induces ER stress independently of MEK/ERK

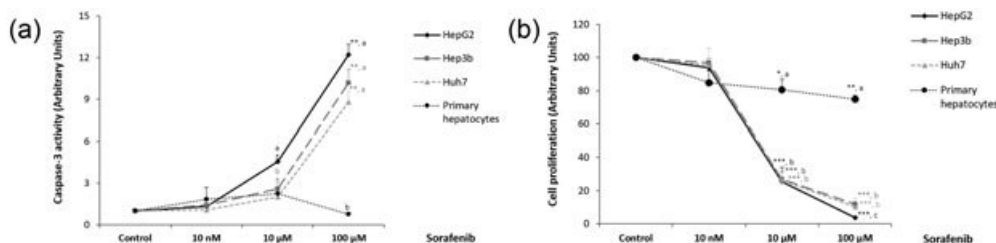


FIGURE 2 Regulation of caspase-3 activity (a) and cell proliferation (b) by sorafenib in HepG2, Hep3b, Huh7, and human primary hepatocytes. Caspase-3 activity was measured by commercial chemiluminescence-based assay as described in Material and Methods. Cell proliferation was determined by BrdU incorporation as described in Material and Methods. The variables were evaluated 24 hr after sorafenib (0, 10 nM, 10 μ M, and 100 μ M) administration. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean of 3–5 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ between control and sorafenib-treated cells. The groups with different letters (a, b, or c) were significantly different ($p \leq 0.05$)

through PERK and IRE1 pathways that are related to increased apoptosis and autophagy markers respectively in HepG2 and PLC/PRF/5. In agreement with these studies, our data showed that sorafenib ($\geq 10 \mu\text{M}$) not only increased the ratio of $\text{Ser}^{51}\text{P-eIF2}\alpha/\text{eIF2}\alpha$ protein expression (Figure 3a) and the protein expression of the C/EBP homologous protein (GADD153 or CHOP; Figure 3b) at 6 hr, but also that of IRE1 α (Figure 3c), and the mRNA expression of XBP1s/XBP1 ratio (Supporting Information Figure S2) at 12 hr. Interestingly, we have observed that sorafenib reduced ATF6 protein expression (Figure 3d) at the same range of concentration and time period as increased PERK and IRE1 pathways (Figure 3a and 3c, respectively).

3.4 | Sorafenib decreased $\text{Ser}^{2481}\text{P-mTOR}$ phosphorylation, impaired initiation of protein synthesis and increased transient autophagy

The induction of apoptosis by sorafenib has been related to an alteration of protein translation characterized by a reduction of eIF4E phosphorylation and Mcl-1 translation, but unassociated with MEK/ERK down-regulation in HCC cells (Liu et al., 2006). The mTOR integrates nutrient and mitogen signals to regulate cell growth and cell proliferation. Different pathways have been shown to regulate mTOR signaling by antitumoral agents. The ATF4-mediated increase in the expression of sestrin-2 caused by nelfinavir- and bortezomib-induced AMPK activity

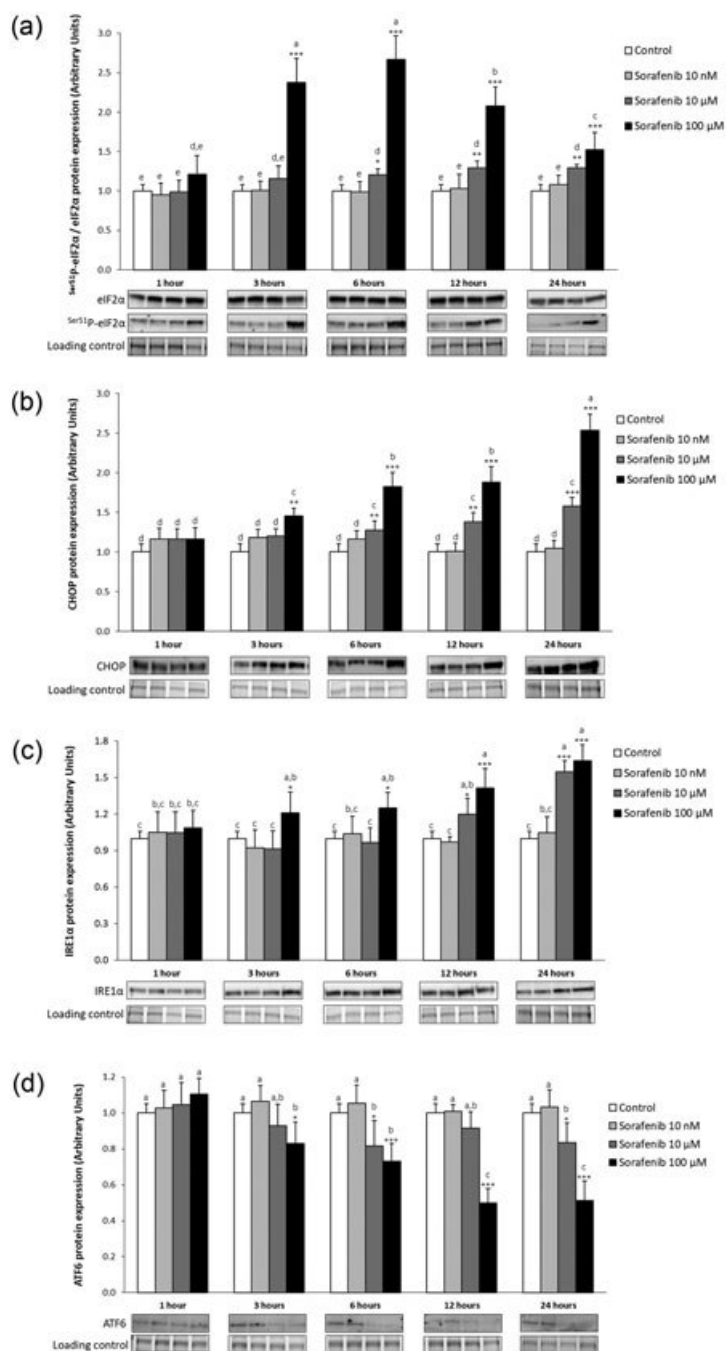


FIGURE 3 Expression of markers from all three branches of ER stress altered by sorafenib in HepG2 cells. A kinetic analysis of the protein expression of $\text{Ser}^{51}\text{P-eIF2}\alpha/\text{eIF2}\alpha$ (a), CHOP (b), IRE1 α (c) and ATF6 (d) were determined at different sorafenib concentrations (0, 10 nM, 10 μM , and 100 μM) by western-blot analysis as described in Material and Methods. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots are representative of five independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ between control and sorafenib treated cells. The groups with different letters (a, b, c, d, or e) were significantly different ($p \leq 0.05$). ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; ER, endoplasmic reticulum

inhibits mTOR and triggers autophagy in breast, ovarian, and cervical cancer cell lines (Brüning, Rahmeh, & Friese, 2013). Sorafenib promoted an early perturbation of the mitochondrial function, ATP depletion and AMPK-dependent inhibition of the mTORC1 pathway in breast cancer cells (Fumarola et al., 2013). In addition, the sustained activation of phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt upregulating mTOR has also been related to sorafenib resistance in HCC cells (Chen et al., 2011). In the current study, we observed that sorafenib (10 μ M) caused an early and progressive reduction (3–24 hr) of $\text{Ser}^{2481}\text{P-mTOR}$ phosphorylation in HepG2 (Figure 4a), as well as in Hep3B and Huh7 cells (Supporting Information Figure S3). Sorafenib (10 μ M) induced an early upregulation of $\text{Thr}^{308}\text{P-Akt}$ phosphorylation (6–12 hr) followed by downregulation of $\text{Thr}^{308}\text{P-Akt}$ and $\text{Ser}^{473}\text{P-Akt}$ phosphorylation (24–48 hr; Figure 4b). Sorafenib also induced a rapid and transient increase of $\text{Thr}^{172}\text{P-AMPK}$ phosphorylation (6–12 hr; Figure 4c). Data suggest that mTOR inhibition may be related to the combined signaling of Akt inhibition and AMPK activation.

The inhibition of mTOR by sorafenib has a great impact on protein translation. The polysome profiles in control cells were obtained by observing free 40S and 60S ribosomal subunits, 80S ribosomes, and actively translating polysomes. However, sorafenib (10 μ M) resulted in abnormal polysome profiles, with a dramatic increase of the 80S peak and a reduction of polysomes (Figure 4d). Salt treatment dissociated most of the 80S peak into free 40S and 60S ribosomal subunits, indicating that the large 80S ribosome population was mostly nontranslating vacant ribosomes rather than monosomes engaged with mRNA (Supporting Information Figure S4).

The nutrient deprivation, growth factor withdrawal or hypoxia are related to autophagy induction (He & Klionsky, 2009). The most important pathways involved in autophagy modulation are mTORC1 and AMPK (Prieto-Dominguez et al., 2016). We used the double fluorescent-tagged LC3 (pDest-LC3-GFP-mCherry) plasmid to distinguish autophagosomes from autolysosomes, transmission electronic microscopy (TEM), and biochemical markers to follow

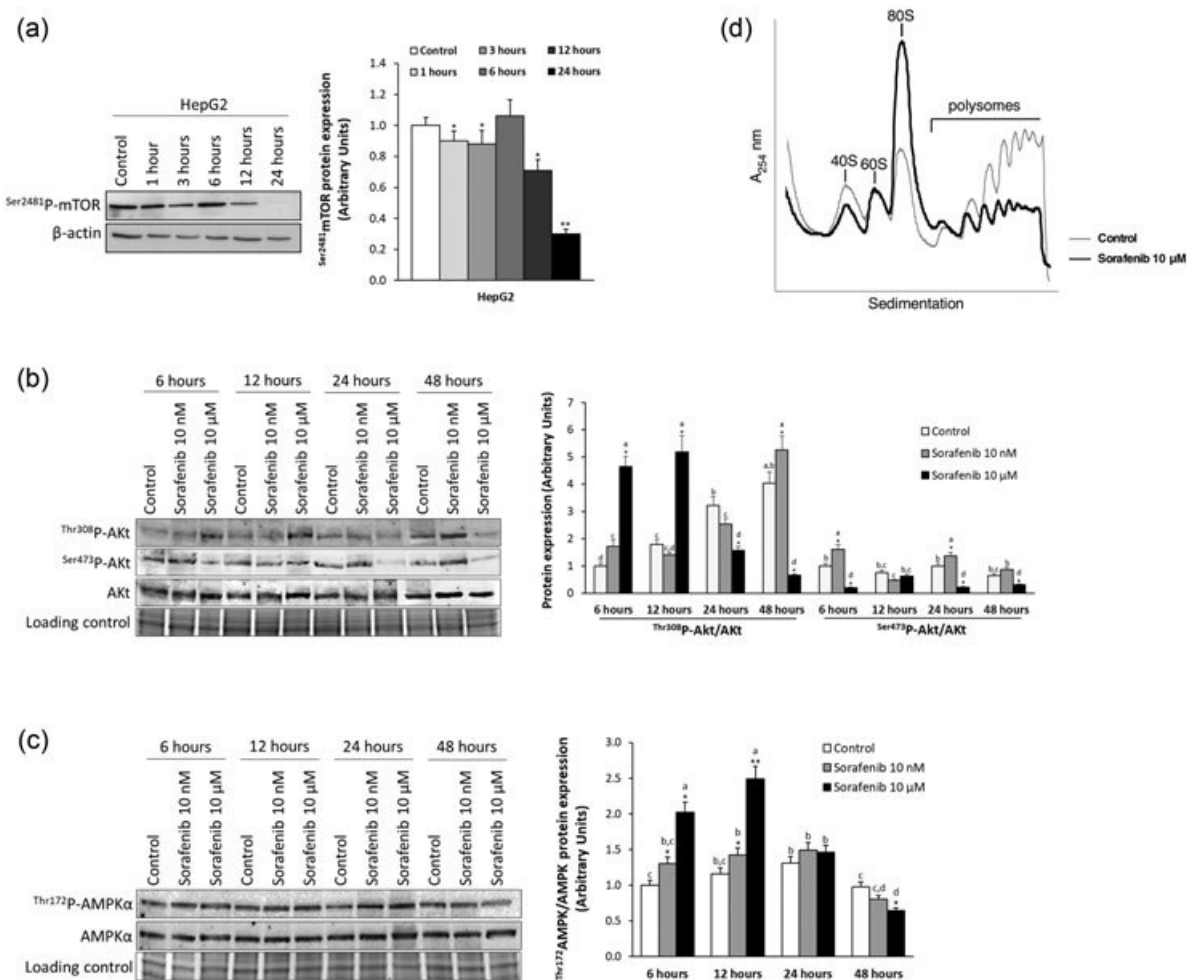


FIGURE 4 Kinetic study of the phosphorylation of mTOR (a), Akt (b), AMPK (c), as well as the alteration in the polysome profile (d) in HepG2 cells treated with sorafenib (10 μ M). The protein expression was determined by western-blot. Polysome profiles were generated following the procedure described in Material and Methods after 12 hr of sorafenib (10 μ M) treatment. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots are representative of four independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ between control and sorafenib-treated cells. The groups with different letters (a, b, c, or d) were significantly different ($p \leq 0.05$). AMPK, 5'AMP-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin

the induction and progression of autophagy flux. We found that sorafenib induced autophagolysosome formation in mRFP-EGFP-LC3-transfected cells (Figure 5a), a fact confirmed by TEM imaging (Figure 5b). The quantification of the phagolysosomes (black line) and phagosomes (grey line; Supporting Information Figure S5) and biochemical markers (p62, Beclin-1, and LC3II/I) in HepG2 (Figure 5c) showed that autophagy induced by sorafenib (10 μ M) was only transiently active (6–12 hr).

3.5 | The inhibition of the ER stress and AMPK downregulated autophagy and increased apoptosis in sorafenib-treated HepG2 cells

We have evaluated the specific role of ER stress arms and AMPK on autophagy and apoptosis using si-RNA technology and dorsomorphin, respectively. Data showed that IRE1 α and PERK were deeply involved in sorafenib-induced autophagy, whereas a minor effect of ATF6 was also observed (6 hr; Figure 6a). Thus, the reduction of autophagy by si-IRE1 α and si-PERK increased sorafenib (10 μ M)-induced caspase-3 activity (Figure 6b) and PARP cleavage (Figure 6c) in HepG2.

Moreover, the AMPK inhibition by dorsomorphin reduced ^{Thr172}P-AMPK/AMPK, ^{Ser413}P-Foxo3a/Foxo3a, and Beclin-1 expression induced by sorafenib (Figure 6d; 12 hr). However, the sustained reduction of the activating phosphorylation of ^{Thr172}P-AMPK/AMPK by dorsomorphin was related to a drastic upregulation of Beclin-1 expression (Figure 6d), and downregulation of caspase-3 activity (Figure 6e) and PARP cleavage (Figure 6f) at 24 hr in sorafenib-treated HepG2 cells. In addition, the antiapoptotic properties of autophagy were further confirmed using autophagic inhibitors 3MA and CQ by the upregulation of sorafenib (10 μ M)-induced caspase-3 activity (Figure 6g) and PARP cleavage (Figure 6h) in HepG2 (24 hr).

3.6 | Sorafenib regulated the activation of JNK and Foxo3a, and the expression of proapoptotic, and antiapoptotic Bcl-2 family members

The Bcl-2 family is a well characterized protein family including antiapoptotic members (Bcl-2, Mcl-1, and Bcl-xL), proapoptotic effectors (Bax and Bak) and proapoptotic BH3-only members, which include the BH3-only direct activators Bim, Bid, and Puma (Kim et al., 2006) and the sensitizers/repressors such as Noxa, Bad, Bik, Bmf, and HRK (Willis et al., 2007). The interactions among them, as well as with the autophagic component Beclin-1, result in a potential switch between autophagic and apoptotic cell death pathways. The induction of apoptosis by sorafenib has been related to activation of Bax and Bak, and increased expression of proapoptotic “BH3-domain only” PUMA and BIM, as well as decreased protein levels of the antiapoptotic Mcl-1 (Fernando et al., 2012). The expression of Bim, Bak, Bax, tBid, Bcl-2, Bcl-xL, Beclin-1, and Mcl-1 in sorafenib (10 nM and 10 μ M)-treated HepG2 cells is shown in Figure 7a and Supporting Information S6a and S6b. The line chart in Figure 7b shows the profile throughout time in the expression of

mentioned proteins. Our data suggest that sorafenib (10 μ M) induced a rapid drop of Mcl-1 protein expression, as well as transient and moderate increase of tBid, Bim_{EL}, Bcl-2 and Bcl-xL (3–6 hr) overlapping with the increase of Beclin-1 (3–12 hr). The expression of tBid drastically dropped below the control value at 6 hr, and Bcl-2, Bcl-xL and Beclin-1 expressions were reduced at 12 hr after sorafenib treatment (Figure 7b). Among the proapoptotic members, only Bim_{EL} showed a sustained increase throughout the kinetic study, reaching the highest value at 24 hr (Figure 7). Bak also showed a moderate rise throughout the study, while Bax expression increased transiently (3–6 hr) returning expression to the control level (Figure 7).

The activation of JNK has been related either to ER-related autophagy (Ogata et al., 2006) or apoptosis (Dhanasekaran & Reddy, 2008) according to different experimental conditions. The stimulation of ER-induced autophagy by sorafenib showed above was associated with the transient activation of JNK as measured by ^{Thr183, Tyr185}P-JNK1/2/JNK1/2 ratio (3–12 hr; Figure 7c and 7d). The inhibition of the ^{Thr183, Tyr185}P-JNK1/2/JNK1/2 ratio was assessed using the specific inhibitor SP600125 (Figure 7d). The treatment reduced cell proliferation in control and sorafenib-treated HepG2 cells (33% and 41% at 12 hr, and 53% and 22% at 24 hr, respectively; Figure 7e). In contrast, SP600125 increased caspase-3 in control and sorafenib-treated HepG2 cells (Figure 7f).

The activation of Foxo and its proapoptotic properties is under regulation of multiple cell signaling (Farhan et al., 2017). The inhibitory phosphorylation ^{Thr32}P-Foxo3a was transiently upregulated at 6–12 hr, while dropped afterwards in sorafenib (10 μ M)-treated HepG2 cells (Figure 7g).

The role of Bim, Bak, and Bax has also been assessed using si-RNA technology. The reduction of Bim, but not Bak and Bax, by si-RNA recovered caspase-3 control levels in sorafenib (10 μ M)-treated HepG2 (Figure 8a; 24 hr). The reduction of apoptosis by si-RNA Bim was associated with upregulation of p62 expression and LC3II/LC3I ratio, but without alteration of Beclin-1 expression in sorafenib-treated HepG2 cells (Figure 8b). The immunoprecipitation experiments showed that Bim, but not Bak and Bax, was able to bind Beclin-1 (Figure 8c).

4 | DISCUSSION

Sorafenib is, to date, the only approved first-line systemic therapy for patients in advanced stages of HCC. This chemotherapeutic drug has demonstrated a moderate but significant increase of mean overall survival in patients with good liver function based on the results in SHARP and Asia-Pacific clinical trials (7.9 to 10.7 months in Llovet et al., 2008; and from 4.2 to 6.5 months in Cheng et al., 2009; respectively). Beneficial effects have also been reported in patients with thyroid cancer, acute myeloid leukemia, advanced renal cell carcinoma, or prostate cancer (Antar, Kharfan-Dabaja, Mahfouz, & Bazarbachi, 2015; Chi et al., 2008; Escudier et al., 2007; Luo et al., 2014). Although sorafenib has been effective in extending the overall

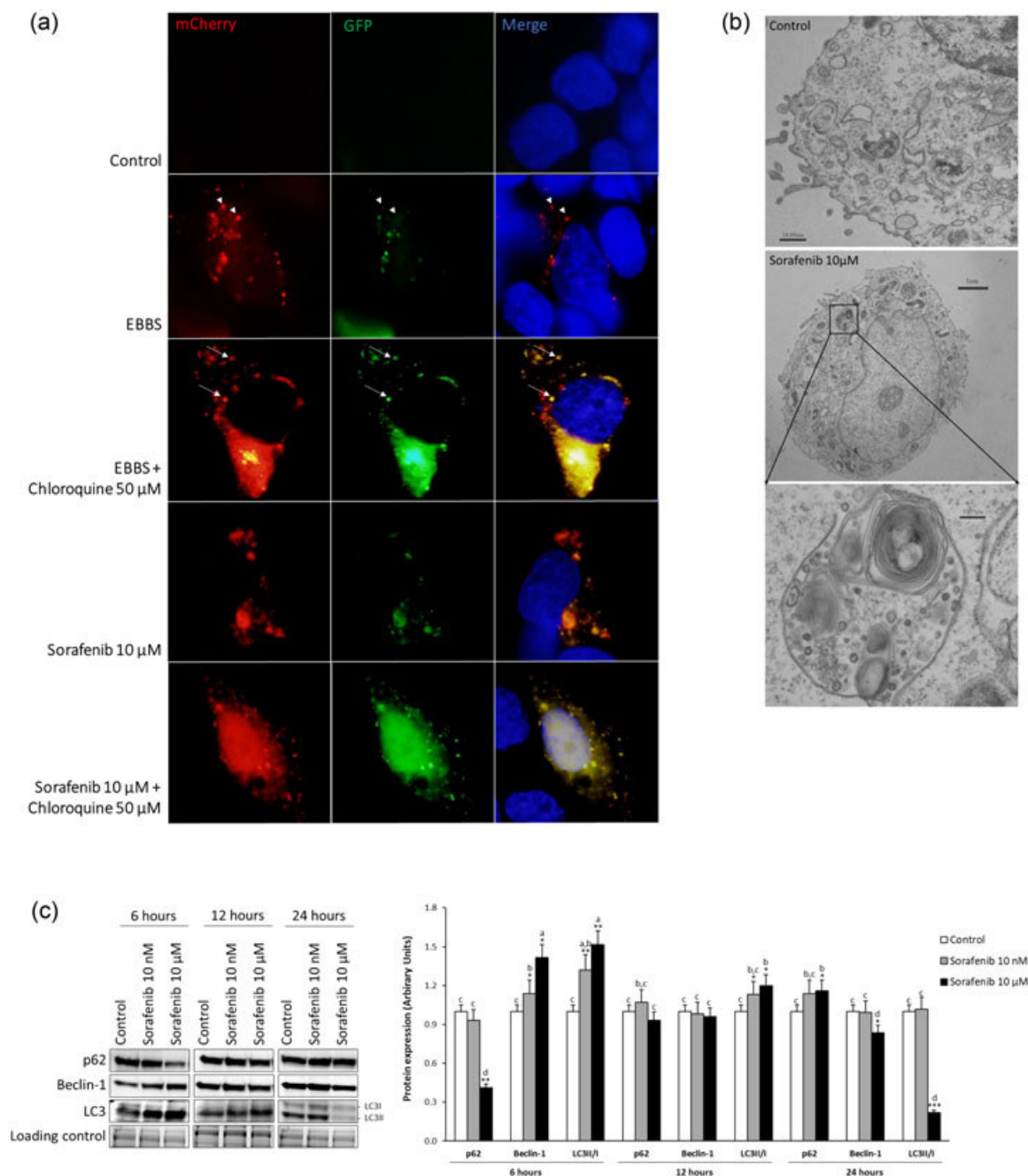


FIGURE 5 Evaluation of autophagic flux (a), presence of autophagolysosomes by electronic transmission microscopy (b) and expression of autophagy markers p62, Beclin-1, and LC3II/I (c) in HepG2 cells treated with sorafenib (10 nM and 10 μ M). The autophagic flux was assessed in HepG2 transfected with double-tagged pDest-LC3-GFP-mCherry plasmid, which is a pH-sensitive sensor to monitor autophagy in live cells (6 hr). The GFP tag is acid-sensitive while the mCherry tag is acid-insensitive. Yellow merge punctate structures indicate autophagosomes which neutral pH allows both tags emit fluorescent light resulting in a yellow staining. Subsequent fusion of autophagosomes with lysosomes results in red-positive acidic vacuoles where the green fluorescence from GFP is lost. Arrows indicate a typical example of colocalized particles of GFP and mCherry signal, while the arrowhead indicates a typical example of a particle with mCherry signal but without GFP signal due to its degradation. Sorafenib was used at a concentration of 10 μ M, while EBBS was used as positive control treatment and chloroquine (50 μ M) was used to inhibit autophagic flux. The presence of autophagolysosomes in HepG2 cells treated with sorafenib (10 μ M) was also detected by transmission electronic microscopy (12 hr) following the procedure described in Material and Methods. The protein expression of autophagy markers (p62, Beclin-1, and LC3 II/I) was assessed at 6, 12 and 24 hr in sorafenib (10 nM and 10 μ M)-treated HepG2 cells by western-blot procedure as described in Material and Methods. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots and images are representative of four independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ between control and sorafenib-treated cells. The groups with different letters (a, b, c, or d) were significantly different ($p \leq 0.05$) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

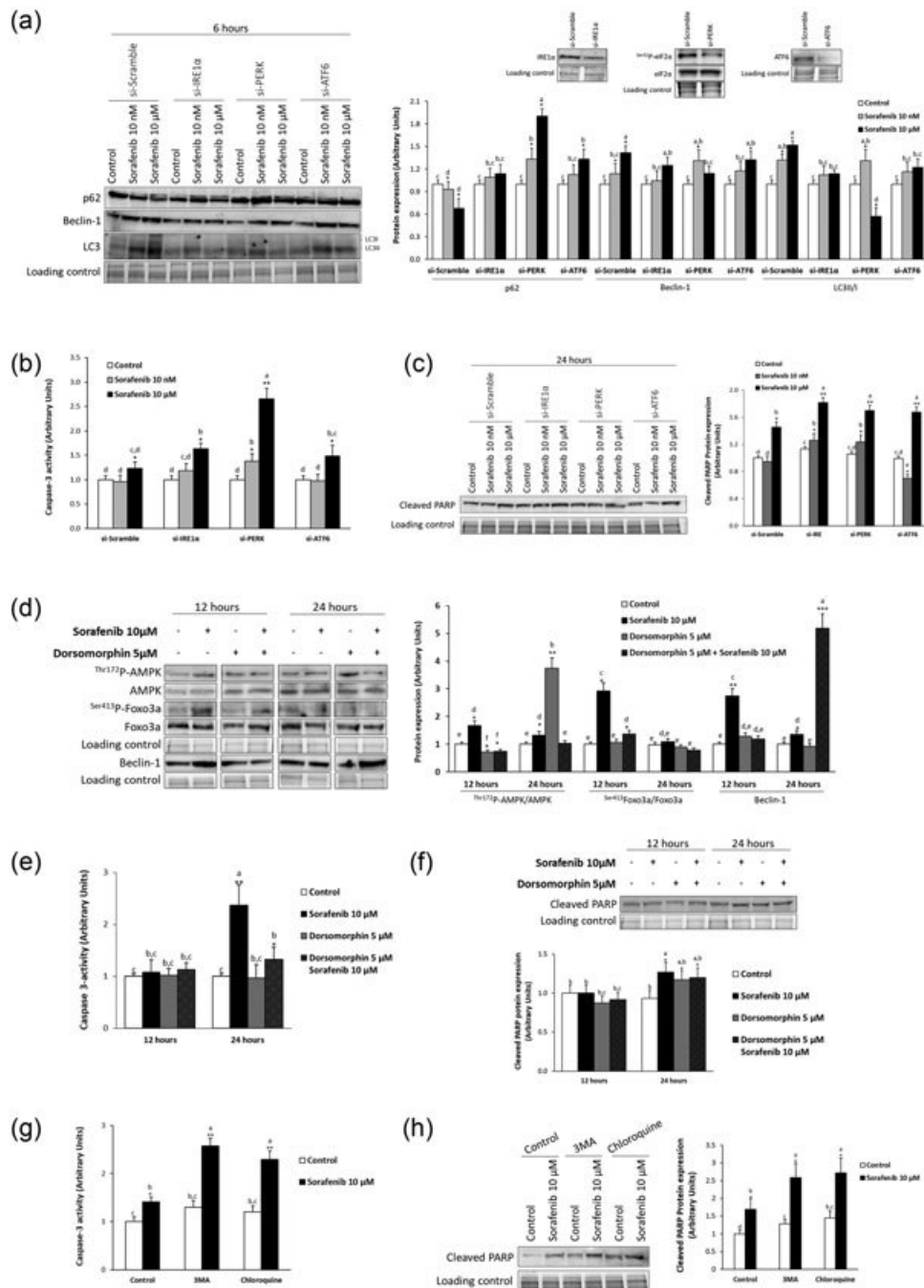


FIGURE 6 Effect of knock-down of ER stress branches, and inhibition of AMPK and autophagy in sorafenib-induced autophagy and apoptosis in HepG2. HepG2 cells were first transfected with IRE1 α , PERK, and ATF6 si-RNA duplexes for 48 hr to assess their role in autophagy (a) and apoptosis (b,c). The expression of IRE1 α , $\text{Ser}^{51}\text{P-eIF2}\alpha/\text{eIF2}\alpha$ and ATF6 was determined to validate si-IRE1 α , si-PERK, and si-ATF6 treatments (a). Afterwards, cells were treated for 6 hr with sorafenib (10 nM and 10 μ M) and harvested for analysis. The inhibition of AMPK was carried out by dorsomorphin (5 μ M) with or without coadministration with sorafenib (10 μ M) being measured $\text{Thr}^{172}\text{P-AMPK}/\text{AMPK}$, $\text{Ser}^{473}\text{FOXO3a}/\text{FOXO3a}$, and Beclin-1 (d) as well as caspase-3 activity (e) and cleaved PARP (f) at 12 and 24 hr. The inhibition of autophagy by 3-methyl adenine (3MA; 5 μ M) or chloroquine (50 μ M) administered 2 hr before sorafenib (10 μ M) induced caspase-3 activity (g) and cleaved PARP protein expression (h) at 24 hr. Autophagy was biochemically followed by the measurement of p62, Beclin-1 and LC3II/I protein expression by western-blot analysis as described in Material and Methods. Apoptosis was analyzed by caspase-3 activity and cleaved PARP protein expression as described in Material and Methods. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots are representative of four independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ between Control and sorafenib-treated cells. The groups with different letters (a, b, c, d, e, or f) were significantly different ($p \leq 0.05$). AMPK, 5'/AMP-activated protein kinase; ER, endoplasmic reticulum; PERK, pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase

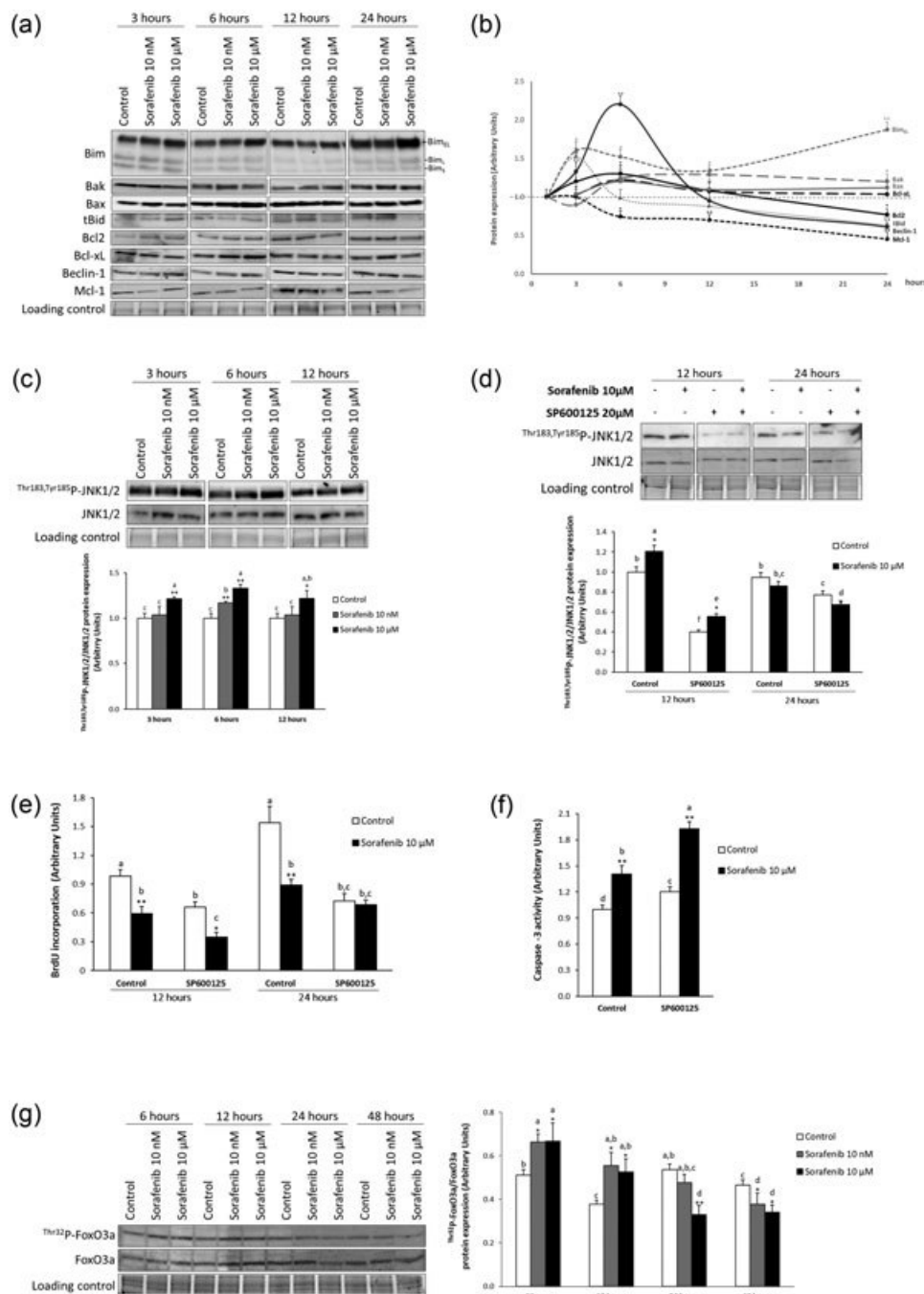


FIGURE 7 Kinetic study of the expression of Bcl-2 family members and Beclin-1 (a,b), JNK phosphorylation (c), and its inhibition on JNK phosphorylation (d), cell proliferation (e) and caspase-3 (f), as well as Foxo3a phosphorylation (g) in sorafenib-treated HepG2 cells. The effect of sorafenib (10 nM and 10 μ M) on the expression of Bcl-2 family members and Beclin-1 were followed at 3, 6, 12, and 24 hr by western-blot analysis. The effect of sorafenib (10 nM and 10 μ M) on the $\text{Thr}^{183}, \text{Tyr}^{185}$ -JNK1/2/JNK1/2 and Thr^{32} -P-Foxo3a/Foxo3a protein expression ratio was determined at different time points according to the experiment (3–48 hr). The inhibition of JNK was assessed by the administration of SP600125 (20 μ M) added to cell culture 12 hr before sorafenib (10 μ M) treatment. Cell proliferation was determined by BrdU incorporation as described in Material and Methods. Caspase-3 activity was measured by commercial chemiluminescence-based assay as described in Material and Methods. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots are representative of four independent experiments. $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ between control and sorafenib-treated cells. The groups with different letters (a, b, c, d, e, or f) were significantly different ($p < 0.05$). JNK, c-Jun-N-terminal kinase

survival of patients, only a minor percentage of patients (2%) displayed partial response to therapy based on response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) criteria (Llovet et al., 2008), the low response rate being mainly attributed to intrinsic resistance of HCC

cells to sorafenib (Villanueva & Llovet, 2012). Several studies have provided mutational profile and identified an average of 30–40 mutations per tumor; among which 5–8 might be driver mutations, as well as high-level amplifications of oncogenes in specific chromosome

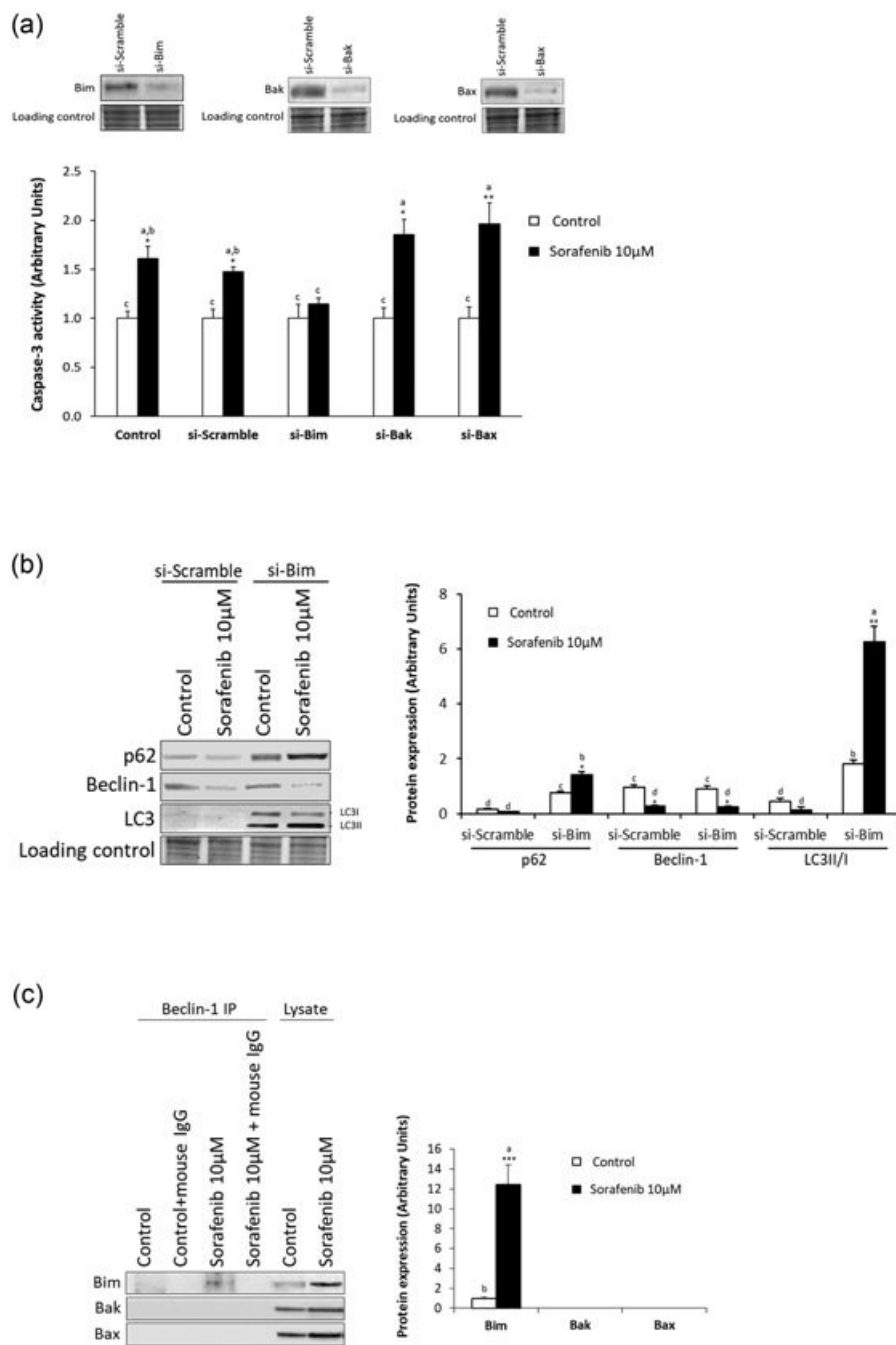


FIGURE 8 Effect of knock-down of Bim, Bak, and Bax on caspase-3 activity (a) and autophagic markers (p62, Beclin-1, and LC3II/I) (b), as well as the binding capacity of Beclin-1 to Bim, Bak, and Bax (c) in sorafenib-treated HepG2 cells. The expression of Bim, Bak, and Bax was determined to validate si-Bim, si-Bak, and si-Bax treatments (a). The variables were determined at 24 hr after sorafenib (10 μ M) administration. Caspase-3 activity was measured by commercial chemiluminescence-based assay as described in Material and Methods. The protein expression of autophagy markers and proapoptotic Bcl-2 family members was assessed by western-blot analysis. The immunoprecipitation procedure of Beclin-1 is described in Material and Methods. The immunoprecipitation using unspecific mouse IgG and anti-Beclin-1 antibodies were run in parallel. The expression of Bim, Bak, and Bax has also been measured in the cell lysate. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, and with the blots are representative of eight independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ between control and sorafenib-treated cells. The groups with different letters (a, b, c, and d) were significantly different ($p \leq 0.05$)

regions. All influence high resistance and reduced extended survival rate during sorafenib treatment in HCC (Llovet, Villanueva, Lachenmayer, & Finn, 2015).

Sorafenib triggers antiproliferative and antiangiogenic effects through inhibition of the activity of several tyrosine kinase receptors including VEGFR-2/3, PDGFR- β , Flt3, and c-Kit, nonreceptor tyrosine kinase receptors such as Flt3, as well as Raf serine/threonine kinase (Cervello et al., 2012; Wilhelm et al., 2004). Antiproliferative and antiangiogenic effects induced by sorafenib, both in vitro and in vivo conditions, are driven through different mechanisms and promote apoptosis via both the extrinsic and the intrinsic pathway in HCC cells (Fernando et al., 2012). The in vivo administration of sorafenib (200 mg/kg) reduced tumor growth characterized by reduction of cell

proliferation (ki67) and promoted apoptosis (caspase-3, cleaved PARP, and TUNEL) in tumors developed from subcutaneously HCC implanted cells in nude mice (Figure 1 and Supporting Information Figure S1). Sorafenib also increased Beclin-1 and LC3II/LC3I, but did not reduce the p62 expression in tissue homogenate, which may reflect high autophagic turnover in coexistence with apoptotic processes (Figure 1d). The effectiveness of sorafenib is probably a result of a balance between targeting cancer cells and the microenvironment (Llovet et al., 2015). In this sense, it is interesting to notice that the administration of sorafenib reduced fibrogenesis (α -SMA), angiogenesis (CD31), and the presence of hematopoietic stem cells (CD34) in tumors (Supporting Information Figure S1). These results, as well as those related to the antiproliferative

properties of the drug, are mostly dependent on the inhibition of tyrosine kinase receptors and the Raf/MEK/ERK.

The mechanism by which sorafenib induces apoptosis is not fully elucidated, and the effectiveness and adverse events are related to the dose used. The mean trough sorafenib concentration is 4.3 ± 2.5 mg/L in cancer patients under sorafenib monotherapy with the recommended dose (400 mg, 12 hr), which are increased up to 7.7 ± 3.6 mg/L in patients who experienced grade 3 drug-related adverse events (Blanchet et al., 2009). The corresponding therapeutic concentration of sorafenib used in the study is 10 μ M. It has been associated with the inhibition of phosphorylation of the initiation factor eIF4E and loss of the antiapoptotic Bcl-2 family members Mcl-1 which appear to occur through a MEK/ERK independent mechanism in different cancer cell lines treated with sorafenib (Rahmani, Davis, Bauer, Dent, & Grant, 2005; Yu et al., 2005). Mcl-1, an antiapoptotic member of the Bcl-2 family, has been shown to be an important factor for apoptosis resistance in HCC (Fleischer et al., 2006). Sorafenib (10 μ M) reduced the level of P-eIF4E and Mcl-1 at 2 and 16 hr after treatment in HepG2 and PLC/PRF/5 cells (Liu et al., 2006). However, we found that there is no temporal relationship between Mcl-1 downregulation and induction of apoptosis by sorafenib in HCC cells. In our conditions, caspase-3 activity was significantly increased 24 hr after the administration of sorafenib (10 μ M) in HepG2 cells. HCC cells with mutated p53 (Huh7) and nonsense p53 mutation (Hep3B) required high sorafenib concentration (100 μ M) to induce caspase-3 activation (Figure 2a). Data showed that the antiproliferative and proapoptotic kinetics induced by the drug were more potent in HCC cell lines than in primary human hepatocytes (Figure 2). In this sense, primary human hepatocytes were resistant to the proapoptotic properties of sorafenib treatment (Figure 2a). This aspect is relevant for the specificity of sorafenib for liver cancer cells instead of healthy hepatocytes. We undertook experiments to identify the differential pattern of miRNA expression upon sorafenib treatment among primary human hepatocytes and cancer cells.

One well-characterized function of mTORC1 is to maintain protein synthesis through phosphorylation of at least two direct targets, eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding proteins (4E-BPs) and ribosomal protein S6 kinases (S6Ks) (Hay & Sonenberg, 2004). mTOR is regulated by different cell signaling involving ER stress, AKT, and AMPK (Rashid, Yadav, Kim, & Chae, 2015). The induction of PERK signaling by antitumoral drugs inhibits mTOR and triggers autophagy in different cancer cell lines (Bruning et al., 2013). Sorafenib (10 μ M) significantly increased PERK- and IRE1 α -related signaling at 6 hr in HepG2 cells (Figure 3). The significant reduction of ATF6 (Figure 3d) may be related to the alteration of trafficking between the ER and the Golgi apparatus, as well as the overall secretory pathway induced by sorafenib (Yi et al., 2012). The activation of PERK and IRE1 α signaling was associated with alteration of Thr¹⁷²P-AMPK (Figure 4c) and Ser²⁴⁸P-mTOR (Figure 4a). In addition, the early downregulation of mTOR activation appeared not to be related to reduced AKT phosphorylation. In fact, Thr³⁰⁸P-AKT increased 6–12 hr after sorafenib administration in HepG2 (Figure 4b). The activation of survival pathways on mTOR

inhibition has been associated with upregulation of IGF-I receptor in breast (O'Reilly et al., 2006) and rhabdomyosarcoma (Wan, Harkavy, Shen, Grohar, & Helman, 2007) cell lines. The inhibition of the mTOR pathway is in agreement with the drastic alteration of polysome profile we observed in sorafenib-treated HepG2 cells. In agreement with Sauzay et al. (2018), sorafenib induced a blockage of translation at initial stage (Figure 4d and Supporting Information Figure 4).

The most important pathways involved in autophagy modulation are mTORC1 and AMPK (Prieto-Dominguez et al., 2016). The inhibition of mTOR by sorafenib appeared to be stronger in HepG2 (Figure 4a) than in Hep3B and Huh7 (Supporting Information Figure S3). However, the activation of autophagic process using the tandem pDest-LC3-GFP-mCherry plasmid transfected to sorafenib-treated cells (Figure 5a), TEM (Figure 5b) and biochemical markers (Figure 5c) were more closely correlated to the activation of ER stress (Figure 3) and AMPK (Figure 4c) than mTOR inhibition (Figure 4a). The respective use of si-RNA and inhibitory compounds showed that ER stress (Figure 6a) and AMPK activation (Figure 6d) played an essential role during sorafenib-induced autophagy in HepG2. The inhibition of autophagy by si-IRE1 α and si-PERK, as well as 3MA, and CQ increased caspase-3 (Figure 6b and 6g, respectively) and PARP cleavage (Figure 6c and 6h, respectively). It was also interesting to notice that the downregulation of autophagy by reduction of Thr¹⁷²P-AMPK/AMPK ratio using dorsomorphin observed at 12 hr was followed by a drastic upregulation of Beclin-1 (Figure 6d) and reduction of caspase-3 activity (Figure 6e) and PARP cleavage (Figure 6f) in sorafenib-treated HepG2 cells at 24 hr. The experiments confirmed Thr¹⁷²P-AMPK/AMPK ratio was positively correlated to the Ser⁴¹³P-Foxo3a/Foxo3a ratio (Figure 6d). Our results support the survival properties of autophagy, and it may suggest an autophagic alternative activation pathway in dorsomorphin and sorafenib cotreated HepG2 cells.

Urano et al. (2000) reported that ER stress and, in particular the IRE1 kinase activity, increases JNK activity. The autophagic process, as apoptosis, appeared to be tightly regulated by anti- and proapoptotic members of the Bcl-2 family. The activation of the autophagic process (6–12 hr) by sorafenib was associated with a drastic increase of Beclin-1 expression, which it was preceded by rapid downregulation of Mcl-1 and upregulation of tBid and Bim_{EL}, while Bcl-2 and Bcl-xL remained at moderate levels during this period after drug administration (Figure 7a and 7b, and Supporting Information Figure S6). Interestingly, tBid and Bim_{EL} have been shown to promote autophagy by displacing Beclin-1 from its interaction with Bcl-2 (Erlich et al., 2007; Marquez & Xu, 2012). In fact, Beclin-1 has been identified as a BH3-only protein (Maiuri et al., 2007) that allows its interaction with Bcl2 and its homologue Bcl-xL (Oberstein, Jeffrey, & Shi, 2007). The expression of Beclin-1 (Park et al., 2009) and Bcl-2 phosphorylation that disrupts Beclin-1-Bcl-2 complex-1 (Wei, Pattingre, Sinha, Bassik, & Levine, 2008) have been related to the activation of JNK1. It was interesting to observe that Thr¹⁸³,Tyr¹⁸⁵P-JNK1/2/JNK1/2 was induced by sorafenib (10 μ M) during the period in which autophagy was activated (3–12 hr; Figure 7c). The inhibition of Thr¹⁸³,Tyr¹⁸⁵P-JNK1/2/JNK1/2 (Figure 7d) by SP600125 was related to a reduction in cell proliferation (Figure 7e) that resulted in an increased apoptosis (Figure 7f), suggesting that JNK played a survival role during

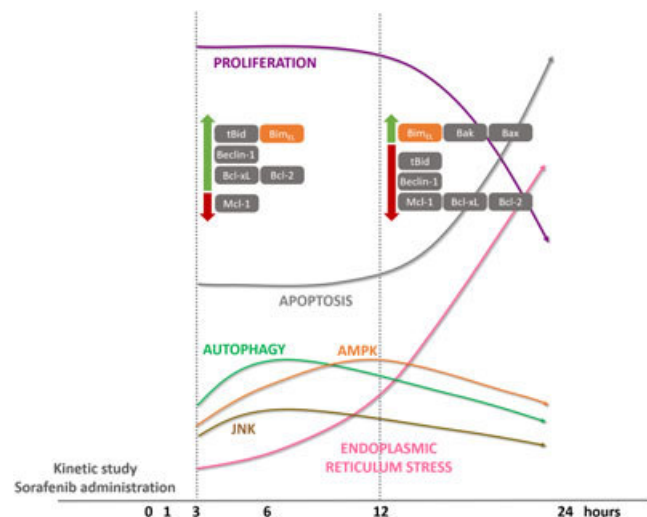


FIGURE 9 The early sorafenib-induced ER stress and the regulation of JNK and AMPK-dependent signaling were related to the induction of the survival autophagic process. The shift from autophagy to apoptosis was related to the decline of tBid, Beclin-1, Mcl-1, Bcl-xL, and Bcl-2, as well as the increase of proapoptotic BimEL, Bak, and Bax. BimEL appeared to be critical for the induction of apoptosis by sorafenib. AMPK, 5'AMP-activated protein kinase; ER, endoplasmic reticulum; JNK, c-Jun-N-terminal kinase [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

sorafenib-induced apoptosis. In addition, a timeframe relationship existed between JNK and AMPK activation, supporting the existence of a complex signaling module involving LKB1, AMPK and JNK, in which early phase of JNK activation was also promoting cell survival by inducing AMPK activity, whereas the late phase of JNK activation induced apoptosis (Yun et al., 2009).

The activation of apoptosis by sorafenib was coincident with a sustained increase in Bim_{EL} expression, remaining Bak and Bax at a moderate expression level (Figure 7a and 7b, and Supporting Information Figure S6). JNK has also been observed to induce phosphorylation of Bim, promoting its release from its binding to dynein and myosin V motor complexes (Lei & Davis, 2003). Sorafenib (10 μ M) induced a sustained and progressive increase of CHOP expression (6–24 hr; Figure 3b). The main effector of PERK-mediated apoptosis is the proapoptotic transcription factor CHOP which can be induced by ATF4, ATF6, as well as XBP1s (Verfaillie, Salazar, Velasco, & Agostinis, 2010). Interestingly, CHOP suppresses the expression of the antiapoptotic Bcl-2 (McCullough, Martindale, Klotz, Aw, & Holbrook, 2001) and promotes the transcription of the proapoptotic BH3-only protein Bim (Puthalakath et al., 2007). The induction of thapsigargin-induced ER has also been related to a stabilization of Bim by PP2A-related dephosphorylation that prevents its ubiquitination and degradation, as well as by transcriptional regulation though CHOP-ATF4 in breast cancer cells (Puthalakath et al., 2007). The expression of Bim is also under positive transcriptional regulation of Foxo3a (Nakamura & Sakamoto, 2008) whose activity is regulated by a plethora of kinases such as GSK3 β , MST1, JNK, CS1, AMPK, and Akt (Farhan et al., 2017). As described above, a positive correlation appeared between ^{Thr172}P-AMPK/AMPK ratio and related activation

phosphorylation of ^{Ser413}P-Foxo3a/Foxo3a ratio (Figure 6d). In addition, PI3K/Akt survival signaling increases the inhibitory phosphorylation ^{Thr32}P-Foxo3a, preventing its nuclear translocation and transcriptional activity (Brunet et al., 1999). Our study also showed that the expression of Bim_{EL} raised shortly after sorafenib administration which was maintained at moderate expression levels during autophagic-related phase (6–12 hr). This expression level might be the result of the interaction between the upregulation of ^{Thr308}P-Akt (Figure 4b)-dependent ^{Thr32}P-Foxo3a (Figure 7g), and ^{Thr172}P-AMPK (Figure 4c)-dependent ^{Ser413}P-Foxo3a (Figure 6d) in sorafenib-treated HepG2. Additional studies should be undertaken to identify the relevance of each pathway in the expression of Bim_{EL}. The sustained increase of PERK and CHOP expressions (Figure 3a and 3b, respectively) and reduction of Akt phosphorylation (24 hr; Figure 4b) supports Bim_{EL} upregulation during sorafenib-induced apoptotic phase (24 hr) in HepG2. The administration of Bim si-RNA, but not Bak or Bax, prevented sorafenib-induced caspase-3 activity in HepG2 cells (Figure 8a). The reduction of apoptosis by Bim si-RNA was associated with upregulation of p62 expression and LC3II/LC3I ratio, but without alteration of Beclin-1 expression in sorafenib-treated HepG2 cells (Figure 8b). The proapoptotic BH3-only members such as Bim_{EL}, and others like BNIP3, Bad, Bik, Puma, and Noxa, induce autophagy by disrupting the Beclin-1-Bcl2 complex (Marquez & Xu, 2012). The immunoprecipitation studies demonstrated the formation of Beclin-1 and Bim complex (Figure 8c). In this sense, our study may also suggest that the absence of Bim by si-RNA promotes the induction of early autophagic structures by sorafenib (10 μ M) independently of Beclin-1 expression which remain at low level at 24 hr (Figure 8b).

In conclusion, our study showed that the induction of ER stress by sorafenib was the driving mechanism involved in the sequential induction of autophagy and apoptosis in HepG2 cells (Figure 9). The early sorafenib-induced ER stress and regulation of JNK and AMPK-dependent signaling were related to the induction of survival autophagic process (3–12 hr). The sustained treatment with sorafenib induced a progressive increase of ER stress and PERK-CHOP-dependent rise of Bim_{EL}, which induced the shift from autophagy to apoptosis (24 hr). However, the kinetic of Bim_{EL} expression profile might also be related to the tight balance between Akt- and AMPK-related signaling in Foxo3a-dependent Bim_{EL} upregulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CIBEREHD and CIBERNED, founded by the ISCIII and cofinanced by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF, for their financial support. The tandem fusion pDest-LC3-GFP-mCherry was kindly provided by Dr. Terje Johansen (Molecular Cancer Research Group, Department of Medical Biology, University of Tromsø-The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no commercial associations that might create a conflict of interest in connection with the present submitted

manuscripts. The authors declare there are any competing financial interests in relation to the work described.

ORCID

Jordi Muntané  <http://orcid.org/0000-0002-6744-1121>

REFERENCES

- Antar, A., Kharfan-Dabaja, M. A., Mahfouz, R., & Bazarbachi, A. (2015). Sorafenib maintenance appears safe and improves clinical outcomes in FLT3-ITD acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 15(5), 298–302.
- Blanchet, B., Billefont, B., Cramard, J., Benichou, A. S., Chhun, S., Harcouet, L., ... Tod, M. (2009). Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(4), 1109–1114.
- Bruix, J., Reig, M., & Sherman, M. (2016). Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 150(4), 835–853.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., ... Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857–868.
- Brüning, A., Rahmeh, M., & Friese, K. (2013). Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Molecular Oncology*, 7(6), 1012–1018.
- Cervello, M., Bachvarov, D., Lampiasi, N., Cusimano, A., Azzolina, A., McCubrey, J. A., & Montalto, G. (2012). Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell Cycle*, 11(15), 2843–2855.
- Colella, A. D., Chegenii, N., Tea, M. N., Gibbins, I. L., Williams, K. A., & Chataway, T. K. (2012). Comparison of stain-free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Analytical Biochemistry*, 430(2), 108–110.
- Chen, K. F., Chen, H. L., Tai, W. T., Feng, W. C., Hsu, C. H., Chen, P. J., & Cheng, A. L. (2011). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(1), 155–161.
- Chen, K. F., Tai, W. T., Liu, T. H., Huang, H. P., Lin, Y. C., Shiau, C. W., ... Cheng, A. L. (2010). Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3. *Clinical Cancer Research*, 16(21), 5189–5199.
- Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., ... Guan, Z. (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: A phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*, 10(1), 25–34.
- Chi, K. N., Ellard, S. L., Hotte, S. J., Czaykowski, P., Moore, M., Ruether, J. D., ... Seymour, L. (2008). A phase II study of sorafenib in patients with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer. *Annals of Oncology*, 19(4), 746–751.
- Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245–6251.
- Erlich, S., Mizrachy, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., ... Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*, 3(6), 561–568.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczyluk, C., Oudard, S., Siebels, M., ... Bukowski, R. M., Group TS. (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356(2), 125–134.
- Farhan, M., Wang, H., Gaur, U., Little, P. J., Xu, J., & Zheng, W. (2017). FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(7), 815–827.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S35–S50.
- Fernando, J., Sancho, P., Fernández-Rodríguez, C. M., Lledó, J. L., Caja, L., Campbell, J. S., ... Fabregat, I. (2012). Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *Journal of Cellular Physiology*, 227(4), 1319–1325.
- Fischer, T. D., Wang, J. H., Vlada, A., Kim, J. S., & Behrns, K. E. (2014). Role of autophagy in differential sensitivity of hepatocarcinoma cells to sorafenib. *World Journal of Hepatology*, 6(10), 752–758.
- Fleischer, B., Schulze-Bergkamen, H., Schuchmann, M., Weber, A., Biesterfeld, S., Müller, M., ... Galle, P. (2006). Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, 28(1), 25–32.
- Fribley, A., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2009). Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods in Molecular Biology*, 559, 191–204.
- Fumarola, C., Caffarra, C., La Monica, S., Galetti, M., Alfieri, R. R., Cavazzoni, A., ... Bonelli, M. A. (2013). Effects of sorafenib on energy metabolism in breast cancer cells: Role of AMPK-mTORC1 signaling. *Breast Cancer Research and Treatment*, 141(1), 67–78.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18(16), 1926–1945.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43, 67–93.
- Huynh, H., Ngo, V. C., Koong, H. N., Poon, D., Choo, S. P., Thng, C. H., ... Soo, K. C. (2009). Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8B), 2673–2683.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. -C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. D., & Cheng, E. H. Y. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*, 8(12), 1348–1358.
- Kressler, D., de la Cruz, J., Rojo, M., & Linder, P. (1997). Fal1p is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(12), 7283–7294.
- Lei, K., & Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2432–2437.
- Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., ... Carter, C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 66(24), 11851–11858.
- Luo, Y., Shi, Y., Xing, P., Wang, L., Feng, Y., Han, X., & He, X. (2014). Sorafenib in metastatic radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: A pilot study. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(1), 87–92.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., ... Bruix, J., for the SHARP Investigators Study Group. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390.
- Llovet, J. M., Villanueva, A., Lachenmayer, A., & Finn, R. S. (2015). Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(8), 436–436.
- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., & Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Diseases Primers*, 2, 16018.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., ... Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal*, 26(10), 2527–2539.

- Marquez, R. T., & Xu, L. (2012). Bcl-2:Beclin 1 complex: Multiple mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *American Journal of Cancer Research*, 2(2), 214–221.
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., & Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1249–1259.
- Nakamura, T., & Sakamoto, K. (2008). Forkhead transcription factor FOXO subfamily is essential for reactive oxygen species-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 281(1–2), 47–55.
- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., ... Rosen, N. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*, 66(3), 1500–1508.
- Oberstein, A., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 13123–13132.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., ... Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9220–9231.
- Ou, D. L., Shen, Y. C., Yu, S. L., Chen, K. F., Yeh, P. Y., Fan, H. H., ... Cheng, A. L. (2010). Induction of DNA damage-inducible gene GADD45beta contributes to sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 70(22), 9309–9318.
- Park, K. J., Lee, S. H., Lee, C. H., Jang, J. Y., Chung, J., Kwon, M. H., & Kim, Y. S. (2009). Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(4), 726–729.
- Pichard, L., Raulet, E., Fabre, G., Ferrini, J. B., Ourlin, J. C., & Maurel, P. (2006). Human hepatocyte culture. *Methods in Molecular Biology*, 320, 283–293.
- Prieto-Domínguez, N., Ordóñez, R., Fernández, A., García-Palomo, A., Muntané, J., González-Gallego, J., & Mauriz, J. L. (2016). Modulation of autophagy by sorafenib: Effects on treatment response. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 151.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., ... Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337–1349.
- Rahmani, M., Davis, E. M., Bauer, C., Dent, P., & Grant, S. (2005). Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35217–35227.
- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 11(11), 1956–1977.
- Rodríguez-Arribas, M., Pizarro-Estrella, E., Gómez-Sánchez, R., Yakhine-Diop, S. M. S., Gragera-Hidalgo, A., Cristo, A., ... Fuentes, J. M. (2016). IFDOTMETER: A new software application for automated immunofluorescence analysis. *Journal of Laboratory Automation*, 21(2), 246–259.
- Sanyal, A. J., Yoon, S. K., & Lencioni, R. (2010). The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *The Oncologist*, 15(Suppl 4), 14–22.
- Sauzay, C., Louandre, C., Bodeau, S., Anglade, F., Godin, C., Saidak, Z., ... Galmiche, A. (2018). Protein biosynthesis, a target of sorafenib, interferes with the unfolded protein response (UPR) and ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 9(9), 8400–8414.
- Shi, Y. H., Ding, Z. B., Zhou, J., Hui, B., Shi, G. M., Ke, A. W., ... Fan, J. (2011). Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis. *Autophagy*, 7(10), 1159–1172.
- Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Tsunematsu, H., Miyagi, T., ... Hayashi, N. (2012). Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 131(3), 548–557.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7(9), 880–885.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664–666.
- Verfaillie, T., Salazar, M., Velasco, G., & Agostinis, P. (2010). Linking ER stress to autophagy: Potential implications for cancer therapy. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 930509–930519.
- Villanueva, A., & Llovet, J. M. (2012). Second-line therapies in hepatocellular carcinoma: Emergence of resistance to sorafenib. *Clinical Cancer Research*, 18(7), 1824–1826.
- Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P., & Helman, L. J. (2007). Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*, 26(13), 1932–1940.
- Wei, Y., Pattinige, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell*, 30(6), 678–688.
- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., ... Trail, P. A. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), 7099–7109.
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., ... Huang, D. C. S. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315(5813), 856–859.
- Yi, P., Higa, A., Taouji, S., Bexiga, M. G., Marza, E., Arma, D., ... Chevet, E. (2012). Sorafenib-mediated targeting of the AAA(+) ATPase p97/VCP leads to disruption of the secretory pathway, endoplasmic reticulum stress, and hepatocellular cancer cell death. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(12), 2610–2620.
- Yu, C., Bruzek, L. M., Meng, X. W., Gores, G. J., Carter, C. A., Kaufmann, S. H., & Adjei, A. A. (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene*, 24(46), 6861–6869.
- Yun, H., Kim, H. S., Lee, S., Kang, I., Kim, S. S., Choe, W., & Ha, J. (2009). AMP kinase signaling determines whether c-Jun N-terminal kinase promotes survival or apoptosis during glucose deprivation. *Carcinogenesis*, 30(3), 529–537.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Rodríguez-Hernández MA, González R, de la Rosa ÁJ, et al. Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by sorafenib in liver cancer cells. *J Cell Physiol*. 2019;234:692–708. <https://doi.org/10.1002/jcp.26855>

Preliminary Studies of the Toxicity of *Agaricus Bisporus* Aqueous Enzymatic Extracts (AbAEE) In Rats

Keywords: *Agaricus bisporus*; AbAEE; Acute toxicity; Chronic toxicity; Rats

Abstract

The health benefits of extracts from *Agaricus bisporus* greatly extend its use as components of new functional foods for the treatment and prevention of diseases, rather than restricting it to a good food with high nutritional value and good flavor. *A. bisporus* aqueous enzymatic extracts (AbAEE) have unique flavor, good taste, and health benefits which makes it a good candidate for its incorporation in different matrices for development of new functional foods and nutraceuticals. The potential use of AbAEE as nutraceutical or incorporated as a part of new functional foods requires its characterization and a subsequent food safety study. The focus of this paper was to carry out a preliminary toxicological study on experimental animals (rats in this case) by acute and sub-chronic oral administration. To evaluate potential adverse effects of AbAEE at high doses the acute toxic class method was used. After administration of the preset doses, behavior changes, toxic symptoms, and deaths were observed continuously for 1 h after treatment and then intermittently at 4th, 8th and 24th h. After these initial observations, the rats were further observed for up to 14 consecutive days for any signs of toxicity and/or death. Because of the likelihood that the results obtained in this preliminary acute toxicity test have a direct relevance for protecting human health with respect to the use of AbAEE as a functional food or nutraceutical, an additional upper dose level of 5000 mg/kg b.wt. was used. Since no death was observed, the LD50 could not be estimated but is expected to exceed 5000 mg/kg and this extract could be classified as hazard category 5 (in Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures.) or even unclassified for its acute toxicity by the oral route. The sub-chronic oral toxicity study of AbAEE (250 and 500 mg/kg b.wt. day) did not induce significant alterations in almost all hematological and biochemical parameters in rats. Therefore, the overall results of the present study provide supportive data on the use of AbAEE and provide a promising first step for their use as component of new functional foods or as nutraceutical. Though, further studies in both, animals and humans are needed for better evaluation of the food safety of this extract.

Introduction

Traditionally, mushrooms have been used to improve human's health [1], among other uses. In this respect, attention has been focused mainly on exotic mushrooms rather than on edible mushrooms. Recently, health benefits of extracts from *Agaricus bisporus* (one of the most consumed edible mushroom worldwide), such as antioxidant activity, immunoprotection, anticholesterolemic and antiviral activity, have been described [2-5]. These properties greatly extend the use of *A. bisporus* and its extracts as components of new functional foods for the treatment and prevention of diseases, rather than restricting its use to a good food with high nutritional value and good flavor [6].

Carbonero-Aguilar P¹, Falcón-García G¹, Gallego-Yerga P¹, del Campo JA², Isabel Moreno N^{3*} and Bautista J^{1*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Sevilla, Spain

²UCM Digestive Diseases & CIBERehd, Valme University Hospital, Spain

³Area of Toxicology, University of Sevilla, Spain

*Address for Correspondence

Isabel Moreno N, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, C/ Profesor García González nº 2, 41012, Sevilla, Spain; Tel: +34 954 556762; Fax: +34 954 233765; E-mail: imoreno@us.es

*Bautista J, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, C/ Profesor García González nº 2, 41012-Sevilla, Spain; Tel: +34954556113; Fax: +34 954556598; E-mail: jdbaut@us.es

Submission: 21 February, 2018

Accepted: 26 March, 2018

Published: 30 March, 2018

Copyright: © 2018 Carbonero-Aguilar P, et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Given the increasing utilization of phytonutrients with health benefits in functional foods formulation and as nutraceuticals, the safety of these products has become a major concern. *A. bisporus* aqueous enzymatic extracts (AbAEE) have unique flavor, good taste, and health benefits which makes it a good candidate for its incorporation in different matrices for development of new functional foods and nutraceuticals. AbAEE contains a high number of bioactive components which could be toxic for humans at high concentrations [7]. However, to the best of our knowledge, the toxicological evaluation of AbAEE had not been studied yet.

The potential use of AbAEE as nutraceutical or incorporated as a part of new functional foods requires its characterization and a subsequent food safety study. Characterization of the main components of AbAEE was addressed by the authors -using Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight-Tandem Mass Spectrometry (LC-QTOF MS/MS) - and recently published [8]. A logical subsequent step was a preliminary toxicological study on experimental animals (rats in this case) by acute and sub-chronic oral administration, looking for establishing a range of allowed concentration, as a first step for application to humans.

Materials and Methods

Mushroom and AbAEE preparation

A. bisporus was supplied by the Grupo Riberebro (Alfaro, La Rioja, Spain), and the AbAEE were obtained according to the process described by Cremades et al. [2]. Briefly, after homogenization, and enzymatic digestion, the hydrolyzate was centrifuged at 8000 × g, resulting in a supernatant and a solid residue. The residue (insoluble material) was discharged, and the supernatant was collected and

used as raw extract, which was ultra filtered through a 50 kDa ultra filtration membrane (Sartorius GmbH, Germany) and concentrated by vacuum at 75 °C 10-fold to obtain the AbAEE.

Experimental animals

Wistar rats weighting 150±20 g for male and 121±18 g for female were used for acute toxicity studies, and rats weighting 103±12 g for male and 94±8 g for female were used for sub-chronic toxicity studies. The rats were supplied by the Central Animal Facility of the University of Seville (Espartinas, Seville, Spain). The animals were allowed to acclimate to the housing conditions for one week and healthy animals were selected for the study.

Four animals per stainless steel cage were housed throughout the study period. Tap water and pellet food for rodent (Panlab, Barcelona) were provided *ad libitum*. The housing conditions were: temperature 23±2 °C, relative humidity 50-70%, air ventilation 10-20 times/h and light intensity 150-300 lux with 12 h light-dark cycles. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the ethic committee of the University of Seville (Spain).

Acute toxicity study

Acute toxicity test was carried out to evaluate any possible adverse effects occurring following oral administration of a single dose of AbAEE. For this study the acute toxic class method was used. This procedure is reproducible and uses very few animals. This method is based in biometric evaluations with fixed doses, adequately separated to enable a substance to be ranked for classification purposes and hazard assessment [9]. Twenty four rats were randomly divided into four groups: one control group (ACT-0) and three treated groups (ACT I-to-III). Each group was composed by 6 rats, 3 per sex (Table 1). After fasting for 12 h, the rats were orally administrated (by gavages) only once with AbAEE dissolved in 2-3 ml of distilled water, at doses 300, 2000 and 5000 mg/kg body weight (b.w.); and the control group was treated with distilled water (10 ml/kg b.w.). After administration of the preset doses, the rats were allowed access to food and water *ad libitum*, and behavior changes, toxic symptoms, and deaths were observed continuously for 1 h after treatment and then intermittently at 4th, 8th and 24th h. After these initial observations, the rats were further observed for up to 14 consecutive days for any signs of toxicity and/or death. Any adverse effects, such as hypoactivity, fur-erection, salivation, and syncope were evaluated immediately after administration of the different doses of AbAEE. Body weights were measured on day 1, 7 and 14, food and water intake were registered every two days and anorexia and weight loss were recorded. All test animals were subjected to gross necropsy and microscopic examination.

Sub-chronic toxicity study

The 90-day study provides information on the possible health hazards likely to arise from repeated exposure over a prolonged

period of time covering post-weaning maturation and growth well into adulthood. The study will provide information on the major toxic effects, indicate target organs and the possibility of accumulation, and can provide an estimate of a no-observed-adverse-effect level of exposure which can be used in selecting dose levels for chronic studies and for establishing safety criteria for human exposure [10].

Sixty rats were randomly divided into three groups: one control group (SCT-0) and two treated groups (SCT I and SCTII), each group integrated by 20 rats, ten per sex (Table 2). Rats in treatment groups were orally administrated with AbAEE at doses 0,250, and 500 mg/kg day for 90 days (13 weeks). Rats in the control group were administrated orally with only water, which was used as a vehicle. According to Wang et al. [11], the higher dose (500 mg/kg) should be estimated as 10% of LD50. In our case, and because estimation of the LD50 was unable, the highest dose assayed for acute toxicity (5000 mg/kg) was used as reference for estimation. Thirty six rats (18 males and 18 females), six per group and sex, were sacrificed at the end of day 90 (13 weeks). The remaining rats in each group were continuously observed during the days following day 90 for four weeks; then sacrificed at the end of day 119 (17 weeks). Blood samples were collected for hematological and biochemical analyses. Body weight, food and water consumption were recorded once a week during the experimental period.

Measurement of blood parameters

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital by intraperitoneal injection, and the blood samples were obtained through abdominal aorta puncture and collected into vials containing sodium citrate for complete blood analysis. Hematological and serum biochemical analyses were performed for 12 rats/group, 6 rats/sex at the end of treatment period (90 days), and 8 rats/group, 4 rats/sex at the end of the recovery period (21 days).

Hematological analysis: The following hematological parameters were analyzed: White Blood Cell (WBC), Red Blood Cell (RBC), Hematocrit (HCT), Hemoglobin (HGB), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Lymphocytes (LYM), Platelet (PLT), Monocytes (MON), Neutrophil Granulocytes (NEUT), Basophils (BAS), Eosinophils (EOS), and Reticulocyte (Ret) were measured using a fully automatic hematology analyzer (Roche Cobas 6000, USA). The count of Ret was calculated by examining the stained blood smears under a light-microscope (Leica DC-300, Germany).

Coagulation parameters, including Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) and Prothrombin Time (PT), were analyzed using a semiautomatic blood coagulation-analyzer (Maccura BCS-04).

Biochemical analysis: Biochemical analyses were carried out in serum. Serum samples were obtained by centrifugation at 1.500 x g for 15 min, and stored at -20 °C until analysis. The biochemical

Table 1: Distribution of control and treated groups for acute toxicity study.

Group:	ACT-0	ACT-I	ACT-II	ACT-III
n	6	6	6	6
Male	3	3	3	3
Female	3	3	3	3
Dose (mg/kg)	0	300	2000	5000

Table 2: Distribution of control and tested groups for sub-chronic toxicity study.

Group	SCT-0	SCT-I	SCT-II
n	20	20	20
Male	10	10	10
Female	10	10	10
Dose (mg/kg)	0	250	500

parameters of serum, including Alanine Transaminase (ALT), Aspartate Transaminase (AST), Alkaline Phosphatase (ALP), Albumin (ALB), Globulin (GLB), Albumin-Globulin Ratio (A/G), Total Protein (TP), Total Bilirubin (TBIL), Creatinine (CREA), Uric Acid (UA), Urea (UREA), Creatine-Kinase (CK), Triglyceride (TG), Total Cholesterol (TCHO), Lactate Dehydrogenase (LDH), and Glucose (GLU), were determined by a fully automatic biochemistry analyzer (Beckman Coulter-AU480, USA). Na⁺, K⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ were determined by an electrolyte analyzer (Roche-AVL9181, USA).

Organ weight and histopathology analysis

Animals were sacrificed after blood collection. Necropsies were performed on all animals at the end of the treatment and recovery periods. The major organs, including heart, spleen, liver, lungs, kidneys, brain, thymus, adrenal gland, uterus, ovary, and testis, were isolated, and absolute organ weights were determined.

For histopathology analysis, only organs of the high dose group (0.75 g/kg) and control group of both sexes were examined, providing no abnormal changes appeared in the treatment group after macroscopic examination. All organs samples (4 µm thick) were fixed in 10% neutral formalin buffer and stained with hematoxylin-eosin dye. The pathological changes were observed under a light-microscope (Leica DC-300, Germany), and the histopathological analysis was conducted by a pathologist who was blind to provenance of the samples.

Statistical analysis

The results are presented as mean value ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using a 2-way Analysis of Variance (ANOVA) with a subsequent Bonferroni post hoc test for pair wise comparisons between various combinations of two groups. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the SPSS 16.0 software.

Results and Discussion

AbAEE could be considered as a functional food or nutraceutical per se or as component of formulations thanks to its health benefits. This extract not only provides nutrients (carbohydrates, proteins, vitamins and minerals) but also it has a unique profile of bioactive components with health benefits, especially those with antioxidant and antiviral activity [2-4].

AbAEE is a complex extract that mainly contains polar compounds due to its aqueous nature [12], but also no polar compounds could be present. The composition of AbAEE as determined by Delgado-Povedano et al. [8] by high quality MS/MS spectra obtained by LC-QTOF MS/MS allowed identification of one hundred twenty-three compounds which were divided into 21 groups, and among which fifty five were described for the first time, including alkaloids, amino acids and derivatives, carboxylic acids and derivatives, mono- and disaccharides, sugar acids and derivatives, fatty acids and conjugates, phospholipids and derivatives, and nucleotides and derivatives, among the most significant.

Most of the so far known compounds in AbAEE are safe; however, some of them have in the past been considered toxic at

relatively low concentration, in particular agaritine, a naturally occurring phenylhydrazine derivative present in wild and cultivated *Agaricus* mushroom species, including the cultivated mushroom *A. bisporus*. Agaritine has been described in some studies as a potential carcinogen; however, the available evidence to date shows that agaritine of cultivated *A. bisporus* mushrooms poses no known toxicological risk to humans [13].

To evaluate the safety of AbAEE as a potential dietary supplement for human consumption (nutraceutical), data regarding acute (LD50) and chronic toxicity are needed to establish potential hazardous effects derived from repeated exposure over a long period of time.

Although in silico search on TOXNET Database for potential toxicity of the 95 compounds found in AbAEE reveals no potential toxicity [14], we decide to test the safety of AbAEE in experimental animals both exposed only once to a very high dose (acute toxicity), and to a relative high dose (sub-chronical toxicity) for long exposure (90 days).

Acute toxicity study of AbAEE

To evaluate potential adverse effects of AbAEE at high doses, an acute toxicity test was carried out. As there was no information on AbAEE about mortality, for animal welfare reasons it was recommended to use the starting dose of 300 mg/kg of bodyweight. In Table 3 is shown the effects and general behavioral changes of the rats following oral administration of AbAEE at the doses of 0.00 (controls), 300 and 2000 mg/kg. The results showed that AbAEE, at 2000 mg/kg b.wt., did not cause mortality or any sign of adverse effects during the 14 days of study, and no abnormal clinical symptoms in fur, eye color, asthenia, anorexia, salivation, piloerection, locomotors activity or diarrheal in all the treated animals, were observed. The body weight and food consumption also remain unchanged when compared to the untreated control group. The internal organs, including liver, kidney, brain, heart, lung, spleen and thymus, of control and treated groups do not show any unusual signs and were found normal in both size and color. It is necessary to take into account the likelihood that the results obtained in this preliminary acute toxicity test have a direct relevance for protecting human health with respect to the use of AbAEE as a functional food or nutraceutical. For this reason and

Table 3: Acute toxicity (2000 mg/kg).

Observation	After administration			
	4 h	8 h	24 h	14 days
Skin and fur	Normal	Normal	Normal	Normal
Eye	Normal	Normal	Normal	Normal
Mucous membrane	Normal	Normal	Normal	Normal
Behavioral patterns	Normal	Normal	Normal	Normal
Salivation	Normal	Normal	Normal	Normal
Lethargy	Normal	Normal	Normal	Normal
Diarrhea	No observed	No observed	No observed	No observed
Tremors	No observed	No observed	No observed	No observed
Coma	No observed	No observed	No observed	No observed
Deaths	No observed	No observed	No observed	No observed

exceptionally, an additional upper dose level of 5000 mg/kg b.wt., was used. Since no death was observed, the LD50 could not be estimated but is expected to exceed 5000 mg/kg. Therefore, it can be admitted that acute toxicity of AbAEE by the oral route can be classified as category 5 or even unclassified in the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). In conclusion, it can be said that the absence of signs of morbidity and mortality in the oral dose study is an evidence of the safety of the short-term oral administration of AbAEE.

Sub-chronic toxicity study of AbAEE

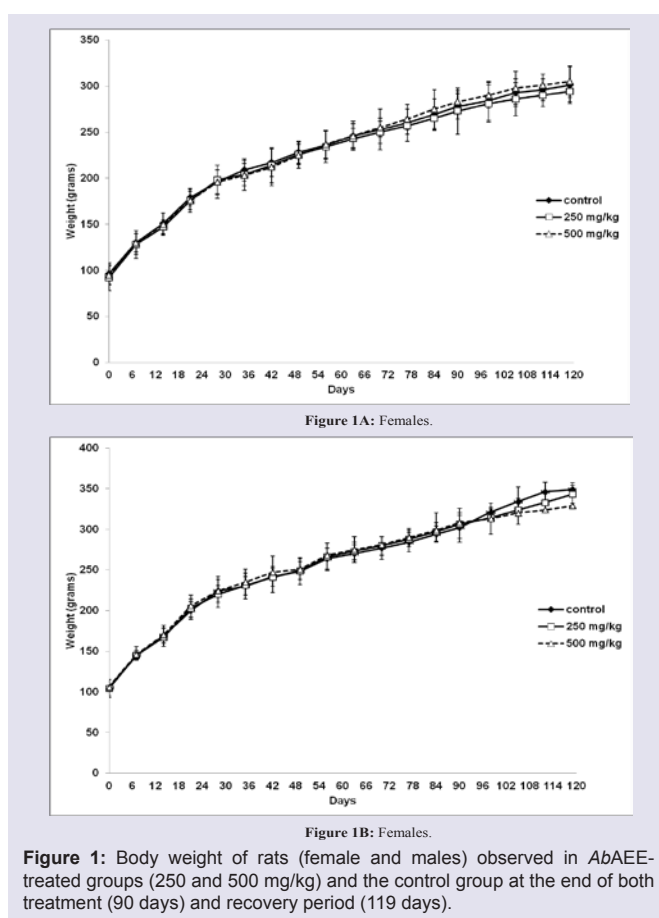
The assessment and evaluation of sub-chronic oral toxicity of AbAEE was carried out in an attempt to obtain information on the possible health hazards caused by repeated exposure over long periods of time. The study was carried out using animals covering post-weaving maturation and growths well into adulthood. No treatment related abnormalities in clinical and behavioral signs or deaths, related with AbAEE treatment, were observed during treatment and recovery periods at any of the assayed doses (250 and 500 mg/kg b.wt.). All animals in the control and AbAEE treated groups survived until the scheduled necropsy on days 90 and 119.

Effects of sub-chronic oral administration of AbAEE on the body weight, food and water consumption: As shown in Figure 1A, no significant difference ($p>0.05$) in the body weight of female rats was observed between AbAEE-treated groups and the control group at the end of both treatment and recovery periods. However, the body weight of male rats subjected to the higher dose (500 mg/kg) was slightly lower than that of the control groups during the recovery period (29 days) 329 ± 11 g and 349 ± 8 g, respectively (Figure 1B). No statistically significant difference was observed in food and water consumption between AbAEE-treated groups and the control group at the end of both treatment and recovery periods (data not shown). The fact that body weight, water and food intakes were not altered during the treatment and recovery periods suggests no serious toxic effects of oral administration of AbAEE. As the changes in body weight have been used as an indicator of adverse effects of drugs and chemicals [15,16], the present results suggest that 500 mg/kg of AbAEE as oral doses are non-toxic in Wistar rats.

Effects of sub-chronic oral administration of AbAEE on blood parameters: At the end of the treatment and recovery periods, blood samples were collected and hematological, coagulation and biochemical parameters of both control and treated groups were measured.

- Effects of AbAEE on hematological parameters

The effect of sub-chronic oral administration of AbAEE on the hematological parameters at the end of treatment and recovery periods is summarized in Table 4. As compared with the control group, most of hematological parameters measured in the treated animal were not significantly different. Statistically significant differences were observed only for HGB in male rats and in HGB and MCV in female rats at the dose of 500 mg/kg day at the end of the treatment period. On the contrary, no significant difference was observed in AbAEE-



treated groups for female and male rats compared with the control group at the end of the recovery period.

Hematological parameters, together with coagulation and biochemical parameters, are relevant to evaluate risks as changes in the hematological system. Also, they are of capital importance as the most sensitive targets for toxic chemicals and as key indices of physiological and pathological status in humans when the data are extrapolated from animal studies [17,18]. In this study with the exception of a short temporary increase in HGB in male rats and in HGB and MCV in female rats at the dose of 500 mg/kg day, no significant differences were found in hematological parameters at the end of the treatment period as compared with the control group; as also didn't at the end of the recovery period; therefore, the results suggest that AbAEE has no influence on these parameters in rats.

- Effects of AbAEE on coagulation parameters

No statistically significant differences in coagulation parameters (APTT and PT) were observed between control and AbAEE-treated groups for female and male rats at the end of both treatment and recovery periods (data not shown).

- Effects of AbAEE on biochemical parameters

Table 5 shows the values of the biochemical parameters at the end of the treatment period, at which all biochemical parameters tested

Table 4: Effect of sub-chronic oral administration of AbAEE on the hematological parameters in Wistar rats after 91 days of treatment and 28 days of recovery.

		←-----Treatment period-----→			←-----Recovery period-----→		
Sex	Parameter	Control	250 mg/Kg/Day	500 mg/Kg/Day	Control	250 mg/Kg/Day	500 mg/Kg/Day
		Treatment period (91 days)	Treatment period (91 days)	Treatment period (91 days)	Treatment period (119 days)	Treatment period (119 days)	Treatment period (119 days)
Male	RCB (10 ⁶ /μl)	9.01±0.52	8.97±0.31	8.89±0.39	9.11±0.32	8.92±0.40	8.90±0.58
	HCT (%)	68.32±2.31	69.71±3.34	70.32±3.24	68.07±1.22	71.21±5.32	71.08±4.87
	HGB (g/dl)	15.30±0.42	15.11±0.53	16.14±0.38*	15.40±0.31	15.32±0.67	15.66±0.45
	MCV (fl)	79.22±3.15	80.07±2.61	79.89±3.13	80.12±2.74	81.31±4.02	81.45±3.78
	MCH (pg)	17.25±0.62	17.03±0.80	17.31±0.52	16.95±1.72	16.98±2.32	17.05±98
	MCHC (g/dl)	20.94±0.63	21.24±0.54	21.43±0.61	20.67±0.93	20.98±1.72	20.93±2.34
	PLT (10 ³ /μl)	910±278	899±346	902±328	903±112	922±167	943±201
	PT (sec)	20.51±2.2	21.9±2.1	21.6±2.7	20.45±1.9	21.01±3.2	20.97±2.65
	WBC (10 ³ /μl)	6.38±1.87	6.65±2.37	6.78±1.93	6.53±1.09	6.34±0.98	6.54±1.23
	NEUT (%)	45.13±9.23	43.70±6.25	42.45±16.38	46.01±8.22	45.73±6.23	45.79±3.25
	LYM (%)	45.52±10.29	48.69±8.01	50.20±17.85	45.00±7.67	46.31±5.23	45.28±6.98
	MON (%)	4.61±0.45	3.52±0.93	3.40±1.70	4.31±0.71	3.31±0.82	4.16±0.83
	EOS (%)	4.23±0.39	3.72±1.11	3.53±1.08	4.06±0.43	4.12±0.65	4.09±0.62
	BAS (%)	0.41±0.21	0.37±0.18	0.32±0.19	0.62±0.17	0.53±0.44	0.67±0.33
Female	RCB (10 ⁶ /μl)	7.95±0.42	7.90±0.44	7.86±0.65	8.06±0.51	7.92±0.55	7.92±0.53
	HCT (%)	66.33±2.81	65.26±3.53	64.98±4.83	68.02±5.72	67.45±6.21	67.93±5.04
	HGB g/dl)	13.52±0.53	14.01±0.74	14.81±0.61*	13.77±1.02	15.01±1.47	14.63±1.03
	MCV (fl)	82.91±2.30	83.13±3.1	88.73±3.03*	83.33±3.22	84.29±2.12	84.11±2.45
	MCH (pg)	17.44±1.02	17.52±0.93	17.91±1.04	17.89±0.97	18.11±2.01	18.04±1.77
	MCHC (g/dl)	20.73±0.41	21.00±0.24	21.12±0.54	21.01±0.88	21.28±1.05	21.67±1.12
	PLT (10 ³ /μl)	877±123	921±254	942±234	902±187	920±89	934±105
	PT (sec)	27.9±10.3	26.01±14.2	24.5±12.8	28.3±3.03	27.16±2.89	27.23±3.45
	WBC (10 ³ /μl)	5.02±1.31	4.79±1.04	4.93±1.76	5.23±0.87	4.95±0.93	4.98±1.32
	NEUT (%)	41.11±9.87	40.81±10.3	51.18±14.23	44.23±11.21	46.42±14.03	45.98±10.08
	LYM (%)	54.27±8.82	54.48±12.67	42.01±11.34	48.43±10.34	47.87±16.34	47.43±8.91
	MON (%)	1.48±1.04	1.06±0.94	2.45±1.88	2.84±0.93	2.06±0.73	2.72±0.94
	EOS (%)	2.65±1.35	3.20±1.24	3.81±1.17	3.96±0.88	3.12±1.81	3.35±1.43
	BAS (%)	0.49±0.30	0.45±0.28	0.45±0.27	0.54±0.13	0.52±0.17	0.51±0.11

were not significantly different between the control and AbAEE-treated groups for female and male rats. Same results were observed at the end of the recovery period with the exception of a statistically significant decrease in female rats between the control group and the 500 mg/kg AbAEE-treated group in two parameters: ALB: 3.54±0.25 and 4.13±0.13 g/dL, respectively, (p <0.01) and TP: 6.09±0.52 and 6.90±0.20 g/dL, respectively, (p <0.05).

- Effects of AbAEE on blood electrolytic parameters

No significant differences were observed between the control and AbAEE-treated groups for female and male rats in blood electrolytic parameters at the end of both treatment and recovery periods (Table 5).

Effects of sub-chronic oral administration of AbAEE on organ weight: Statistically significant decreases between the control and 500 mg/Kg AbAEE-treated group were observed in female rats for absolute brain weight (2.04±0.11 g and 1.91±1.63 g, respectively, p < 0.05) and relative thymus weight (0.28±0.07 g and 0.25±0.03 g, respectively, p < 0.05), at the end of the treatment period. For male rats, a statistically significant decrease between control and 500 mg/Kg AbAEE-treated group was observed for thymus weight (0.40±0.08 g and 0.30±0.07 g, respectively, p < 0.05), whereas the adrenal

gland weight was statistically significant increased (0.05±0.01 g and 0.06±0.03 g, respectively, p < 0.05). At the end of the recovery period, no significant difference was observed in AbAEE-treated groups for female and male rats in organ weights as compared with the control group.

Effects of sub-chronic oral administration of AbAEE on histopathological analysis: For the histopathological analysis, the organs, including heart, spleen, liver, kidneys, lungs, brain, thymus, testis, uterus, and ovary, were examined. No pathological changes were observed in both AbAEE-treated groups and the control group for rats at the end of both treatment and recovery periods (data not shown).

Conclusion

In conclusion, AbAEE cannot be classified for its acute toxicity, as they did not cause either lethality or adverse changes in the general behavior when the highest dose (5000 mg/kg) was administered orally. Thus, this substance could be considered without acute toxicity. The sub-chronic oral toxicity study of AbAEE (250 and 500 mg/kg b.wt. day) only induced significant alterations in some hematological and biochemical parameters in rats. Therefore, the overall results of the present study provide supportive data on the use of AbAEE

Table 5: Effect of sub-chronic oral administration of AbAEE on **biochemical parameters** at the end of treatment and recovery periods.

		←-----Treatment period-----→			←-----Recovery period-----→		
Sex	Parameter	Control	250 mg/Kg/Day	500 mg/Kg/Day	Control	250 mg/Kg/Day	500 mg/Kg/Day
		Treatment period (91 days)	Treatment period (91 days)	Treatment period (91 days)	Treatment period (119 days)	Treatment period (119 days)	Treatment period (119 days)
Male	ALT (U/l)	41.32±5.72	38.93±10.21	36.75±11.44	42.17±6.12	40.98±5.33	40.12±6.82
	AST (U/l)	145.1±42.13	126.8±37.66	115.7±42.16	139.28±32.41	131.82±41.65	144.33±29.05
	ALP (U/l)	83.7±12.7	74.8±17.1	76.0±12.7	77.98±8.19	81.45±12.40	87.34±10.58
	ALB (g/dl)	3.72±0.21	3.80±0.12	3.78±0.13	3.76±0.14	3.91±0.23	3.82±0.14
	GLB (g/dl)	2.43±0.36	2.64±0.13	2.61±0.17	2.55±0.28	2.87±0.05	2.70±0.17
	A/G	1.56±0.19	1.44±0.05	1.45±0.04	1.49±0.11	1.54±0.07	1.42±0.11
	TP (g/dl)	6.15±0.47	6.44±0.23	6.39±0.30	6.31±0.12	6.45±0.27	6.53±0.22
	GLUC (mg/dl)	134.22±22.41	121.35±14.02	129.31±9.23	130.54±8.44	128.52±9.23	131.71±6.25
	BUN (mg/dl)	13.95±1.47	14.79±1.90	15.23±2.34	15.65±1.89	15.32±2.06	15.89±1.07
	CREA (mg/dl)	0.26±0.06	0.25±0.03	0.26±0.05	0.29±0.18	0.30±0.09	0.30±0.15
	TCHO (mg/dl)	78.33±11.21	79.02±9.14	77.65±12.04	79.45±11.12	79.34±21.23	80.03±10.34
	TG (mg/dl)	102.12±13.42	118.23±28.43	112.24±25.32	121.29±23.21	119.76±14.21	123.45±16.37
	Na ⁺ (mmol/l)	135.61±4.85	133.93±2.35	136.92±5.86	138±3.22	139.98±3.65	141.12±4.67
	K ⁺ (mmol/l)	5.36±0.98	5.28±1.11	5.11±0.98	5.27.93±0.96	5.16±0.93	5.09±1.05
Female	Ca ²⁺ (mmol/l)	2.43±0.12	2.62±0.25	2.55±0.43	2.57±0.21	2.64±0.25	2.56±0.40
	Cl ⁻ (mmol/l)	105.07±3.91	104.17±2.83	102.33±4.65	107.51±4.15	106.72±3.76	103.22±5.43
	ALT (U/l)	42.01±3.71	38.85±9.73	37.91±10.45	41.87±6.43	39.67±6.23	40.04±8.12
	AST (U/l)	162.33±17.02	148.98±22.13	145.04±31.17	143.16±29.21	128.11±15.55	131.02±40.14
	ALP (U/l)	79.16±8.37	75.71±12.22	74.98±7.38	77.34±9.12	76.43±19.03	83.16±7.56
	ALB (g/dl)	3.51±0.26	3.68±0.29	3.65±0.17	3.54±0.25	3.61±0.32	4.13±0.13**
	GLB (g/dl)	2.22±0.35	2.47±0.33	2.51±0.20	2.55±0.28	2.24±0.07	2.77±0.20
	A/G	1.60±0.14	1.51±0.08	1.46±0.06	1.40±0.06	1.62±0.19	1.51±0.16
	TP (g/dl)	5.74±0.61	6.15±0.61	6.16±0.36	6.09±0.52	5.85±0.27	6.90±0.20*
	GLUC (mg/dl)	128.12±7.23	132.09±11.01	137.44±9.67	130.11±10.78	135.17±14.23	137.56±9.08
	BUN (mg/dl)	14.08±2.34	16.67±5.34	16.08±4.23	14.54±3.34	16.93±5.45	15.99±4.33
	CREA (mg/dl)	0.32±0.12	0.31±0.08	0.32±0.09	0.33±0.12	0.34±0.10	0.33±0.14
	TCHO (mg/dl)	82.34±9.26	84.11±9.03	85.08±10.34	84.36±7.33	86.21±11.34	87.31±12.31
	TG (mg/dl)	111.64±14.21	123.45±11.08	126.04±20.45	117.55±9.36	128.09±13.79	130.61±16.08
	Na ⁺ (mmol/l)	127.35±5.29	123.78±10.34	122.17±7.74	132.49±12.11	133.06±64	131.12±9.56
	K ⁺ (mmol/l)	5.13±0.78	5.69±0.96	6.05±0.34	5.76±1.24	5.55±0.93	5.67±1.13
	Ca ²⁺ (mmol/l)	2.89±0.36	3.01±0.45	2.96±0.94	3.04±0.37	2.98±0.53	2.92±0.47
	Cl ⁻ (mmol/l)	110.49±7.34	109.72±6.39	111.60±10.22	109.35±4.27	113.26±11.37	115.03±9.83

and provide a promising first step for their use as component of new functional foods or as nutraceutical. However, this is a preliminary study and further studies in both animals and humans are needed for better evaluation of this finding.

References

- Lee KH, Morris-Natschke SL, Yang X, Huang R, Zhou T, et al. (2012) Recent progress of research on medicinal mushrooms, foods, and other herbal products used in traditional Chinese medicine. J Tradit Complement Med 2: 84-95.
- Cremades O, Diaz-Herrero MM, Carbonero-Aguilar P, Gutierrez-Gil JF, Fontiveros E, et al. (2012) Preparation and characterization of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Food Chem 133: 1538-1543.
- Cremades O, Diaz-Herrero MM, Carbonero-Aguilar P, Gutierrez-Gil JF, Fontiveros E, et al. (2015) White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. Food Biosci 10: 42-47.
- Gallego-Yerga P (2015) Study of the inhibition of the NS3 protease involved in the propagation of hepatitis C virus. Final Degree Project. Pharmacy faculty. Sevilla University.
- Gil-Ramírez A, Ruiz-Rodríguez A, Marín FR, Reglero G, Soler-Rivas C (2014) Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. J Funct Foods 11: 589-597.
- Mattila P, Konko K, Euroala M, Pihlava JM, Astola J, et al. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. J Agric Food Chem 49: 2343-2348.
- Shu-Yao T, Tsai-Ping W, Shih-Jeng H, Jeng-Leun M (2007) Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. Food Chem 103: 1457-1464.
- Delgado-Povedano MM, de Medina VS, Bautista J, Priego-Capote F, de Castro MD (2016) Tentative identification of the composition of *Agaricus bisporus* aqueous enzymatic extracts with antiviral activity against HCV: a study by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. J Funct Foods 24: 403-419.
- OCDE (2002) Test No. 423: Acute oral toxicity - acute toxic class method. In: OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. Health Effects pp. 14.
- OCDE (1998) Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. In: OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. Health Effects pp. 10.
- Wang QL, Li H, Li XX, Cui CY, Wang R, et al. (2012) Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid. Food Chem Toxicol 50: 4348-

ISSN: 2328-1723

- 4355.
12. Kalač P (2009) Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review. Food Chem 113: 9-16.
 13. Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P (2010) Mushrooms and agaritine: A mini-review. J Funct Foods 2: 91-98.
 14. TOXNET Database. U.S. National Library of Medicine. National Institutes of Health, USA.
 15. Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA (2002) Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. Sci Pharm 70: 135-145.
 16. Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, et al. (2002) A 90- day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. Toxicology 179: 183-196.
 17. Carrillo JC, Adenuga MD, McKee RH (2014) The sub-chronic toxicity of regular White Spirit in rats. Regul Toxicol Pharmacol 70: 222-230.
 18. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, et al. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Regul Toxicol Pharmacol 32: 56-67.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and Fondos FEDER (Project: IPT-2011-1418-060000; Project: RTC-2015-4039-2). The authors thank Paula Bautista for assistance in the preparation of the manuscript.

JA Del Campo supported by Nicolás Monardes Program from Servicio Andaluz de Salud (SAS)

Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies

José A Del Campo, Paloma Gallego, Lourdes Grande

José A Del Campo, Paloma Gallego, Lourdes Grande, Department of Digestive Diseases, Valme University Hospital and CIBERehd, Sevilla 41014, Spain

ORCID number: José A Del Campo (0000-0002-6037-1028), Paloma Gallego (0000-0002-7233-0127), Lourdes Grande (0000-0001-7685-0464).

Author contributions: Del Campo JA designed the study and drafted the manuscript; Gallego P and Grande L drafted the manuscript and designed the Figure.

Supported by Andalusian Government, No. PI0892-2012; Instituto de Salud Carlos III, PI14/01349 co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF).

Conflict-of-interest statement: Authors declare no conflicts of interest.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: José A Del Campo, PhD, Department of Digestive Diseases, Valme University Hospital and CIBERehd, Avda. Bellavista s/n, Sevilla 41014, Spain. jantonio.delcampo@ciberehd.org
Telephone: +34-955-015485
Fax: +34-955-015485

Received: November 8, 2017

Peer-review started: November 9, 2017

First decision: December 4, 2017

Revised: December 21, 2017

Accepted: January 15, 2018

Article in press: January 15, 2018

Published online: January 27, 2018

Abstract

Inflammation and tumorigenesis are tightly linked pathways impacting cancer development. Inflammasomes are key signalling platforms that detect pathogenic microorganisms, including hepatitis C virus (HCV) infection, and sterile stressors (oxidative stress, insulin resistance, lipotoxicity) able to activate pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β and IL-18. Most of the inflammasome complexes that have been described to date contain a NOD-like receptor sensor molecule. Redox state and autophagy can regulate inflammasome complex and, depending on the conditions, can be either pro- or anti-apoptotic. Acute and chronic liver diseases are cytokine-driven diseases as several proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , tumor necrosis factor- α , and IL-6) are critically involved in inflammation, steatosis, fibrosis, and cancer development. NLRP3 inflammasome gain of function aggravates liver disease, resulting in severe liver fibrosis and highlighting this pathway in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. On the other hand, HCV infection is the primary catalyst for progressive liver disease and development of liver cancer. It is well established that HCV-induced IL-1 β production by hepatic macrophages plays a critical and central process that promotes liver inflammation and disease. In this review, we aim to clarify the role of the inflammasome in the aggravation of liver disease, and how selective blockade of this main pathway may be a useful strategy to delay fibrosis progression in liver diseases.

Key words: Caspase-1; Fibrosis; Hepatitis C virus; Inflammasome; Interleukin-1 α ; Interleukin-1 β ; Liver disease; Non-alcoholic fatty liver disease; NLRP3; Tumor necrosis factor- α

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Inflammasomes are newly recognized vital players in innate immunity. Several factors have been

identified able to activate the NLRP3 inflammasome. Inappropriate activation of NLRP3 can contribute to the onset and progression of various diseases, particularly age-related diseases. It is well established that hepatitis C virus infection plays a critical role in the promotion of liver inflammation and disease, inducing the production of IL-1 β and the activation of NLRP3. NLRP3 inflammasome gain of function aggravates liver disease, resulting in severe liver fibrosis and lately, hepatocellular carcinoma. In non-alcoholic fatty liver disease, the regulation of inflammation processes may prevent the progression of non-alcoholic steatohepatitis to fibrosis.

Del Campo JA, Gallego P, Grande L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. *World J Hepatol* 2018; 10(1): 00-00 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v10/i1/00.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v10.i1.00>

INTRODUCTION

Hepatic inflammation is a common trigger of liver disease, and is considered the main driver of hepatic tissue damage, triggering the progression from non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to severe fibrogenesis and, finally, hepatocellular carcinoma (HCC).

Liver diseases, whose etiology can be diverse, are becoming one of the most serious public health problems. The diseases usually occur in response to chronic hepatocellular injury caused mainly by the abuse of alcoholic intake, chronic infections such as those caused by the hepatitis C virus (HCV), bile duct damage, NAFLD or non-alcoholic steatohepatitis (NASH)^[1] NAFLD was defined for the first time in 1980^[2] as an accumulation of fat (> 5%) in liver cells in the absence of excessive alcohol intake^[3]. The disease affects more than 30% of the population of the western world, especially patients suffering from metabolic syndrome, obesity (76%), and type II diabetes (50%)^[4]. The histological spectrum of NAFLD begins in a simple benign steatosis, evolving to a NASH. From this point, the consequent scarring and tissue replacement begins with type I collagen, developing fibrosis, cirrhosis and finally, in many cases complicating a HCC^[3]. This pathogenesis, which is complex, is explained by two main impacts or damages to the liver tissue: on the one hand, a lipid accumulation in the hepatocytes, to which a second oxidative stress damage is added^[5]. It is this second damage, which produces a lipotoxicity that triggers the inflammatory response by the release of danger-activated molecular patterns (DAMPs) and pathogenic-activated molecular patterns (PAMPs), such as lipopolysaccharide (LPS). Finally, they activate the innate immunity that causes the hepatic inflammation, being able to aggravate the process of fibrosis, ci-

rrhosis, causing HCC.

That is why the knowledge of the relationship between liver disease and uncontrolled activation of the immune response, resulting in aggravating liver inflammation of disease progression, can be crucial for the design of therapeutic strategies blocking the immune response uncontrolled.

PATHOGENESIS OF NAFLD

The pathogenesis of this disease is complex, and is explained by two major impacts or damage to the liver tissue: on the one hand, a lipid accumulation in the hepatocytes, to which a second oxidative stress damage is added^[5].

Lipid accumulation in hepatocytes

The first of these is the abnormal accumulation of triglycerides in the hepatocyte, either due to a high intake of saturated fats and obesity, genetic deficiencies or insulin resistance (IR) due to hyperglycemia and hyperinsulinemia^[6], what is known as metabolic syndrome. Hyperinsulinemia and increased hepatic glucose production induce the expression of the sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c) and the carbohydrate response element binding protein (ChREBP), respectively, which activate in turn the transcription of most of the genes involved in the enzymatic machinery necessary for free fatty acids (FFA) synthesis, decreasing the beta oxidation thereof^[7].

In addition, there are many mediating molecules such as peroxisome proliferator activating ligand receptors (PPAR), among which PPAR- γ , whose expression in conditions of liver damage is usually high, contribute to the accumulation of FFA^[7]. The liver X receptor (LXR), another important mediator, activates genes involved in the synthesis of FFA, such as SREBP-1c and ChREBP, contributing to steatosis^[8]. Finally, the AMP-activated protein kinase (AMPK) functions as a sensor of the energy levels of the cell, stimulating catabolic pathways such as mitochondrial beta oxidation, and inhibiting ATP-consuming processes, such as lipogenesis. All this is done by phosphorylating different proteins involved in these pathways, such as acetyl-CoA carboxylase (ACC), ChREBP and SREBP-1c, which end up being inhibited.

In the process of lipid accumulation, several molecules act as DAMPs and pathogen-activated molecular patterns (PAMPs), that is, molecules that trigger inflammation. These may include the fatty acids, adenosine triphosphate (ATP), uric acid or proteins derived from the extracellular matrix, among others. In addition, recent research suggests that in the liver tissue of humans and mice with steatohepatitis, cholesterol crystals are present within hepatocytes, and they can act as DAMPs.

Oxidative stress and liver inflammation

A second impact that explains the characteristic his-

tological lesions of NAFLD is oxidative stress and lipid peroxidation^[5,9]. As a result of liver damage and liver inflammation, the inflammatory cells and the hepatocyte itself release cytokines, such as TNF- α and reactive oxygen species (ROS). These mediators can cause peroxidation of plasma and mitochondrial membranes, which leads to cell death due to necrosis or apoptosis^[5,9]. All this activates endothelial cells of the liver, which increase the expression of cytokines, and finally activates the hepatic stellate cells (HSCs), producing a phenotypic change, associated with the acquisition of pro-fibrogenic and pro-inflammatory functions^[10].

Significant accumulation of triglycerides and cholesterol in VLDL and LDL particles, added to the oxidative stress developed in the hepatocytes, produces the oxidation of the cholesterol linked to LDL, generating particles of LDL oxidase (oxLDL) that constitute an important risk factor of the disease^[11]. Recent studies show that oxLDL also contribute to the process of cellular inflammation and apoptosis.

ACTIVATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE DURING NAFLD

Excessive lipids accumulation leads to hepatocyte damage, activating an inflammatory response that aggravates the progress of the liver disease, and which, in turn, feeds back the activation of the inflammation^[12].

The immune response of the liver is produced by the action of immune cells such as Kupffer cells, monocytes, neutrophils, dendritic cells (DCs), natural killer cells (NK), and NK T cells (NKT), which initiate and maintain the hepatic inflammation through the production of cytokines and chemokines, especially TNF and interleukin (IL) -1 β , as well as reactive oxygen species^[13].

The triggering of hepatic inflammation, as noted above, is caused by the accumulation of infectious and non-infectious material, which is released during cell damage and is recognized by pattern recognition receptors (PRRs). These PRRs include Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors (CLRs), and several other receptors^[14].

The endogenous molecules produced by cellular damage or stress result in an inflammatory response (DAMPs). These molecules are very diverse and don't have a common structure between them. In the pathology of the liver disease and liver inflammation, induced-inflammation particles are included, such as cholesterol crystals. These cholesterol crystals produce the development, not only of the atheroma plaques, but of the inflammation, being present in humans and mice with NASH^[15] candidates are free fatty acids (FFA) that are released during liver damage. A specific mechanism by which they act is to activate TLR4, while fetuin-A, a 64-kDa protein specific for hepatocytes, is required. It has been proven that the reduction of fetuin-A in mice with high fat diet results in a decrease

of inflammatory signalling mediated by TLR4 in adipose tissue. Normally, in patients with NAFLD, the expression of fetuin-A is high^[16]. Palmitic acid (PA) is another molecule that causes liver inflammation, and it has recently been linked to the TLR2 receptor. The palmitic acid ligand of TLR2 induces the activation of caspase-1 and the release of IL-1 α and IL-1 β , having an evident role in the liver inflammatory process^[17].

Many of these DAMPs activate PRR present in immune cells, of which the TLRs are the best characterized. In liver disease, saturation of fatty acids produces inflammation in the hepatocytes, which increases the induction of caspase-1 activation and the release of IL-1 β . This results in a release of more DAMPs from the hepatocytes, generating a feedback that amplifies the inflammatory response.

Among the various NLR receptors, the NLRP3 inflammasome is the best characterized and associated with a wider range of diseases including infections, auto-inflammatory diseases and other autoimmune diseases. The NLRP3 inflammasome has the characteristic of forming a complex with apoptosis-associated speck-like protein to CARD (ASC), to activate caspase-1 and induce the maturation and secretion of important proinflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18. Cytokines act directly against the damage and infection of the liver tissue^[18].

Role of NLRP3 inflammasome in liver inflammation

Activation of the NLRP3 inflammasome is important in the inflammatory process, and occurs in two steps. The first includes the activation of TLRs by different molecules DAMPs and PAMPs (Figure 1). TLRs belong to the family of PRRs and their function is to maintain tissue homeostasis through the regulation of inflammatory responses. In the liver, TLRs are expressed in Kupffer cells, endothelial cells, DCs, epithelial biliary cells, HSCs and hepatocytes. Activated TLRs activate the cells and contribute to the release of cytokines that facilitate the progression of liver disease. There are at least 13 known TLRs, whose structure is characterized by having a leucine-rich repeat structure (LRR) in the extracellular domain and a Toll/IL-1 receptor (TIR) in its intracellular domain^[19].

TLR4 has an interesting role in liver inflammation and fibrogenesis^[20]. The Kupffer cells of the liver are the first to be attacked by the damage produced, and express TLR4 to which lipopolysaccharides (LPS) bind. This produces the activation of NF- κ B, mitogen-activated protein kinase (MAPK)^[21] extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK1), p38, c-jun N-terminal kinase (JNK) and interferon regulatory factor 3 (IRF3)^[22], which finally triggers the production of proinflammatory cytokines and enhances IFN- β and STAT1 expression^[23]. The proinflammatory stimulus facilitates hepatocyte damage, contributing to the secretion of profibrogenic cytokines such as transforming growth factor beta (TGF- β) and the platelet-derived growth factor (PDGF),

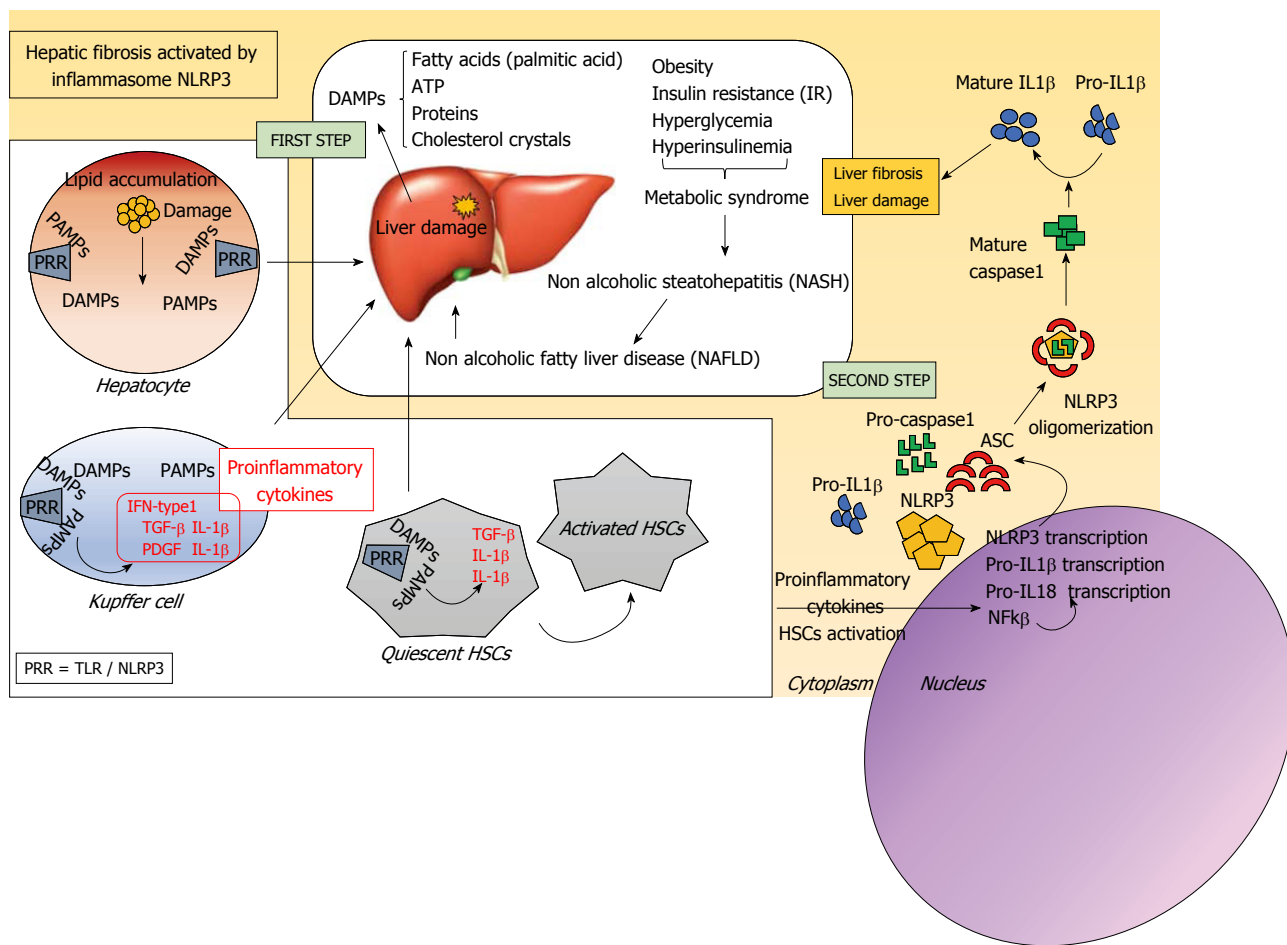


Figure 2 Hepatic fibrosis caused by the activation of the inflammasome-NLRP3 complex. The accumulation of lipids derived from the metabolic syndrome produces a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) that progresses to a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The accumulated lipids, fatty acids, cholesterol crystals, among others, produce an alteration in the homeostasis of the liver cells, producing liver damage. Danger-activated molecular patterns (DAMPs) and pathogenic-activated molecular patterns (PAMPs) bind to and activate PRR receptors (TLRs, NLRPs, etc.) in hepatocytes, immune cells, hepatic stellate cells (HSCs), endothelial cells and DCs. Activated TLRs activate the cells and contribute to the release of cytokines that facilitate progression of liver disease. The proinflammatory stimulus facilitates hepatocyte damage, contributing to the secretion of profibrogenic cytokines such as transforming growth factor beta (TGF- β), promoting the activation of HSCs. This activation, in turn, up-regulates transcription of inflammasome-related components, including inactive NLRP3, pro-IL-1 β and proIL-18^[24,25]. The second step of inflammation activation is the oligomerization of NLRP3 and subsequent assembly of NLRP3, ASC, and procaspase-1 into a complex. This triggers the transformation of procaspase-1 to caspase-1, as well as the production and secretion of mature IL-1 β and IL-18^[18], which produces liver damage and facilitates the progression of hepatic fibrosis.

promoting the activation of HSCs. This activation, in turn, up-regulates transcription of inflammasome-related components, including inactive NLRP3, pro-IL-1 β and proIL-18^[24,25].

The second step of inflammasome activation is the oligomerization of NLRP3 and subsequent assembly of NLRP3, ASC, and procaspase-1 into a complex (Figure 1). This triggers the transformation of procaspase-1 to caspase-1, as well as the production and secretion of mature IL-1 β and IL-18^[18].

NLRP3 signaling during liver inflammation

After NLRs overexpression, members of this family play an important role in the formation of intracellular multiprotein complexes called inflammasomes. The union of microbial components or activators of the inflammasome (DAMPs and PAMPs) that enter the cytoplasm are detected by these cytosolic NLRs, activating the

inflammasome formation. The inflammasome consists of an NLR protein, the adapter molecule ASC and procaspase-1, which is an effector molecule^[26]. The formation of this complex serves to activate cysteine protease caspase-1, which, in turn, produces the maturation of proinflammatory cytokines, including IL-1b and IL-18, and the proteolytic inactivation of IL-33^[27].

In short, and specifically in NAFLD, the saturated fatty acids from the excess lipid in the liver represent harmful endogenous molecules that finally induce the activation of the inflammasome. In addition, hepatocytes exposed to these saturated fatty acids release signals that trigger the activation of immune cells. Activation of the inflammasome activates caspase-1 in Kupffer cells, inducing proinflammatory signaling and activation of HSCs. In this way, collagen deposition occurs that triggers liver fibrosis^[28] have shown that cholesterol crystals could be one pathway

to activate the inflammasome in NASH. To test whether inflammasome blockade alters inflammatory recruitment, they used a drug called MCC950, which has already been shown to block NLRP3 activation, in an attempt to reduce liver injury in NASH. This drug partly reversed liver inflammation, particularly in obese diabetic mice.

Release of cytokines by immune cells

Inflammatory signaling of the liver is regulated by cytokines capable of activating effector functions in immune cells. Kupffer cells are the first to detect the presence of PAMPs and DAMPs through TLRs, activating the release of cytokines such as TNF- α , IL-1 and IL-6, as well as chemokines chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL13), chemokine (C-X-C motif) ligand 8 CXCL-8 and Chemokine (C-C motif) ligand 24 (CCL24), which initiate an acute phase inflammatory response. These cytokines can produce apoptosis of hepatocytes, steatosis and inflammation, including the onset of a fibrosis process after interaction with HSCs *via* TGF- β . Cytokines can also activate hepatic sinusoidal endothelial cells that are ultimately involved in the recruitment of neutrophils, monocytes and NKT cells, being a feature of acute liver damage. Neutrophils can be activated, and their phenotype changed, releasing ROS, defensins and other chemokines that attract more neutrophils and monocytes. Monocytes can be differentiated into TNF- α , IL-1 β , granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) macrophages, increasing the life expectancy of these neutrophils^[29,30]. Finally, the inflammation resolves with the apoptosis of the neutrophils, being these apoptotic neutrophils signals involved in the onset of phagocytosis and in the increase of IL-10 and TGF- β , cytokines related to the end of the inflammatory response and the repair of the tissue^[31].

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a heterogeneous subset of stromal stem cells with immunomodulatory characteristics. MSCs are considered to act through multiple mechanisms to coordinate a dynamic, integrated response to liver inflammation and fibrosis, which prevents the progressive distortion of hepatic architecture. Management of inflammatory patterns is crucial also in case of potential treatment of liver diseases with stem cells^[32]. Adult stem cells have gained in attractiveness over embryonic stem cells for liver cell therapy due to their origin, multipotentiality, and the possibility of autologous transplantation.

ACTIVATION OF HSCS AND HEPATIC FIBROSIS

Any of these necroinflammatory mechanisms described above can activate HSCs, the main ones involved in the process of hepatic fibrogenesis^[33]. In normal liver, stellate cells are described as being in a quiescent

state. Quiescent stellate cells represent 5%-8% of the total number of liver cells^[34]. When the liver is damaged, stellate cells can change into an activated state. The activated stellate cell is characterized by proliferation, contractility, and chemotaxis. This state of the stellate cell is the main source of extracellular matrix production in liver injury^[35].

The hepatic stellate cells are characterized by having in their cytoplasm small droplets of fat 1-2 microns in diameter that allow the storage of vitamin A, one of its main functions. Besides, they control intercellular communication through the release of mediators, and participate in the homeostasis of the MEC of the liver by the production of collagens and non-collagens, synthesis of metalloproteinases (MMP) that catabolize the components of the MEC, and synthesis of inhibitors of MMPs, also called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) that control the catalytic activity of MMPs to maintain a homeostasis of the MEC^[36].

Therefore, after the chronic injury of the liver tissue, both the HSC and other cells producing the ECM undergo activation, a pathological process characterized by the loss of fat droplets, an increase in the number and size of the cells, and phenotypic trans-differentiation to proliferating, fibrogenic and contractile cells, which will be very similar to myofibroblasts. All this is mediated by different factors that induce cell proliferation, fibrogenic mediators such as TGF- β 1 and IL-6, inducers of HSC contraction, such as endothelin-1, thrombin or angiotensin II and finally mediators of anti-inflammatory and anti-fibrogenic activity, such as IL-10 and interferon- γ (IFN- γ)^[36].

Because of the activation of HSCs, phenotypic changes occur that affect the development of hepatic fibrosis, such as the production of collagen and non-collagen proteins of the MEC (collagen type I, type III, type IV, laminin, elastin, fibronectin and various proteoglycans) by the CEH^[37].

CONCLUSION

Many evidences reported in the literature suggest that the activation of the NLRP3 inflammasome complex and the consequent generation of the acute inflammatory response in the liver, facilitates the progress of steatohepatitis to liver fibrosis, cirrhosis and finally, HCC development. However, recent studies show that the KO mice of NLRP6 and NLRP3 inflammasomes have a worse progression in the NAFLD/NASH disease. The absence of the inflammasome is associated with changes in the homeostasis of the intestinal microbiota, resulting in a strong hepatic steatosis and inflammation through TLR receptor agonists, such as TLR4, which allows the release of TNF- α which leads to the progression of NASH^[38]. This demonstrates the complexity of the effects of the activation of the inflammasome, which can generate an acute inflammation or, conversely, be protective. However

and in general terms, this activation is usually proinflammatory in the liver, and its inactivation and absence in relation to the microbiota should be carefully studied. Recently, Pierantonelli *et al*^[39] have shown that the progression of liver fibrosis is associated with the downregulation of NLRP3 in the gut which, together with the current evidence of a strong correlation between intestinal changes (including modification of microbiota composition) and liver disease, makes the role of NLRP3 in the intestine extremely attractive as a protective factor. Finally, MCC950 has been proven as an effective NLRP3 inhibitor, being able to reduce liver injury and inflammation.

REFERENCES

- 1 **Younossi ZM**, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, Neuschwander-Tetri BA, Serfaty L, Negro F, Caldwell SH, Ratzin V, Corey KE, Friedman SL, Abdelmalek MF, Harrison SA, Sanyal AJ, Lavine JE, Mathurin P, Charlton MR, Goodman ZD, Chalasani NP, Kowdley KV, George J, Lindor K. Diagnostic Modalities for Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) and Associated Fibrosis. *Hepatology* 2017 [PMID: 29222917 DOI: 10.1002/hep.29721]
- 2 **Ludwig J**, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; **55**: 434-438 [PMID: 7382552]
- 3 **Chalasani N**, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; **55**: 2005-2023 [PMID: 22488764 DOI: 10.1002/hep.25762]
- 4 **Loomba R**, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; **10**: 686-690 [PMID: 24042449 DOI: 10.1038/nrgastro.2013.171]
- 5 **Buzzetti E**, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016; **65**: 1038-1048 [PMID: 26823198 DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012]
- 6 **Brunt EM**, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, Bugianesi E, Sirlin CB, Neuschwander-Tetri BA, Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015; **1**: 15080 [PMID: 27188459 DOI: 10.1038/nrdp.2015.80]
- 7 **Hassan K**, Bhalla V, El Regal ME, A-Kader HH. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 12082-12101 [PMID: 25232245 DOI: 10.3748/wjg.v20.i34.12082]
- 8 **Chisholm JW**, Hong J, Mills SA, Lawn RM. The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *J Lipid Res* 2003; **44**: 2039-2048 [PMID: 12923232]
- 9 **Begriche K**, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013; **58**: 1497-1507 [PMID: 23299992 DOI: 10.1002/hep.26226]
- 10 **Diehl AM**, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; **54**: 303-306 [PMID: 15647199 DOI: 10.1136/gut.2003.024935]
- 11 **Walenbergh SM**, Koek GH, Bieghs V, Shiri-Sverdlov R. Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins. *J Hepatol* 2013; **58**: 801-810 [PMID: 23183522 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.014]
- 12 **Wree A**, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, Messer K, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)* 2014; **92**: 1069-1082 [PMID: 24861026 DOI: 10.1007/s00109-014-1170-1]
- 13 **Tilg H**, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1467-1476 [PMID: 11078773 DOI: 10.1056/NEJM200011163432007]
- 14 **Martinon F**, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; **10**: 417-426 [PMID: 12191486 DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3]
- 15 **Ioannou GN**, Haigh WG, Thorning D, Savard C. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res* 2013; **54**: 1326-1334 [PMID: 23417738 DOI: 10.1194/jlr.M034876]
- 16 **Ix JH**, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 406-412 [PMID: 20150538 DOI: 10.1681/ASN.2009080820]
- 17 **Miura K**, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology* 2013; **57**: 577-589 [PMID: 22987396 DOI: 10.1002/hep.26081]
- 18 **Ozaki E**, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J Inflamm Res* 2015; **8**: 15-27 [PMID: 25653548 DOI: 10.2147/JIR.S51250]
- 19 **Takeuchi O**, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; **140**: 805-820 [PMID: 20303872 DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022]
- 20 **Iracheta-Vellve A**, Petrasek J, Gyongyosi B, Satishchandran A, Lowe P, Kodys K, Catalano D, Calenda CD, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA, Szabo G. Endoplasmic Reticulum Stress-induced Hepatocellular Death Pathways Mediate Liver Injury and Fibrosis via Stimulator of Interferon Genes. *J Biol Chem* 2016; **291**: 26794-26805 [PMID: 27810900 DOI: 10.1074/jbc.M116.736991]
- 21 **Bian H**, Li F, Wang W, Zhao Q, Gao S, Ma J, Li X, Ren W, Qin C, Qi J. MAPK/p38 regulation of cytoskeleton rearrangement accelerates induction of macrophage activation by TLR4, but not TLR3. *Int J Mol Med* 2017; **40**: 1495-1503 [PMID: 28949380 DOI: 10.3892/ijmm.2017.3143]
- 22 **Hu W**, Jain A, Gao Y, Dozmorov IM, Mandraru R, Wakeland EK, Pasare C. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 13994-13999 [PMID: 26508631 DOI: 10.1073/pnas.1510760112]
- 23 **Kanda T**, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus infection induces the beta interferon signaling pathway in immortalized human hepatocytes. *J Virol* 2007; **81**: 12375-12381 [PMID: 17804510 DOI: 10.1128/JVI.01695-07]
- 24 **Seki E**, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; **48**: 322-335 [PMID: 18506843 DOI: 10.1002/hep.22306]
- 25 **Zhang B**, Xu D, She L, Wang Z, Yang N, Sun R, Zhang Y, Yan C, Wei Q, Aa J, Liu B, Wang G, Xie Y. Silybin inhibits NLRP3 inflammasome assembly through the NAD⁺/SIRT2 pathway in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *FASEB J* 2017 [PMID: 28970254 DOI: 10.1096/fj.201700602R]
- 26 **Dolunay A**, Senol SP, Temiz-Resitoglu M, Guden DS, Sari AN, Sahan-Firat S, Tunctan B. Inhibition of NLRP3 Inflammasome Prevents LPS-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Mice: Contribution of NF-κB, Caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS Isoforms. *Inflammation* 2017; **40**: 366-386 [PMID: 27924425 DOI: 10.1007/s10753-016-0483-3]
- 27 **Csak T**, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, Catalano D, Mandrekar P, Dolganiuc A, Kurt-Jones E, Szabo G. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; **300**: G433-G441 [PMID: 21233280 DOI: 10.1152/ajpgi.00163.2009]
- 28 **Mridha AR**, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD,

- Van Rooyen DM, Haczeyni F, Teoh NC, Savard C, Ioannou GN, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, Feldstein AE, Farrell GC. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol* 2017; **66**: 1037-1046 [PMID: 28167322 DOI: 10.1016/j.jhep.2017.01.022]
- 29 **Bhargava P**, Lee CH. Role and function of macrophages in the metabolic syndrome. *Biochem J* 2012; **442**: 253-262 [PMID: 22329799 DOI: 10.1042/BJ20111708]
- 30 **Nallagangula KS**, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Sci OA* 2017; **4**: FSO250 [PMID: 29255622 DOI: 10.4155/fsoa-2017-0083]
- 31 **Soehnlein O**, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 427-439 [PMID: 20498669 DOI: 10.1038/nri2779]
- 32 **Fagoonee S**, Famulari ES, Silengo L, Camussi G, Altruda F. Prospects for Adult Stem Cells in the Treatment of Liver Diseases. *Stem Cells Dev* 2016 [PMID: 27503633 DOI: 10.1089/scd.2016.0144]
- 33 **Wu X**, Wu X, Ma Y, Shao F, Tan Y, Tan T, Gu L, Zhou Y, Sun B, Sun Y, Wu X, Xu Q. CUG-binding protein 1 regulates HSC activation and liver fibrogenesis. *Nat Commun* 2016; **7**: 13498 [PMID: 27853137 DOI: 10.1038/ncomms13498]
- 34 **Geerts A**. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; **21**: 311-335 [PMID: 11586463 DOI: 10.1055/s-2001-17550]
- 35 **Eng FJ**, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279**: G7-G11 [PMID: 10898741 DOI: 10.1152/ajpgi.2000.279.1.G7]
- 36 **Seki E**, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology* 2015; **61**: 1066-1079 [PMID: 25066777 DOI: 10.1002/hep.27332]
- 37 **Duarte S**, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol* 2015; **44-46**: 147-156 [PMID: 25599939 DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.004]
- 38 **Henao-Mejia J**, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaïss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, Camporez JP, Shulman GI, Gordon JI, Hoffman HM, Flavell RA. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012; **482**: 179-185 [PMID: 22297845 DOI: 10.1038/nature10809]
- 39 **Pierantonelli I**, Rychlicki C, Agostinelli L, Giordano DM, Gaggini M, Fraumene C, Saponaro C, Manghina V, Sartini L, Mingarelli E, Pinto C, Buzzigoli E, Trozzi L, Giordano A, Marziani M, De Minicis S, Uzzau S, Cinti S, Gastalderi A, Svegliati-Baroni G. Lack of NLRP3-inflammasome leads to gut-liver axis derangement, gut dysbiosis and a worsened phenotype in a mouse model of NAFLD. *Sci Rep* 2017; **7**: 12200 [PMID: 28939830 DOI: 10.1038/s41598-017-11744-6]

P- Reviewer: Kanda T, Ozenirler S, Pellicano R, Sazci A

S- Editor: Cui LJ **L- Editor:** A **E- Editor:** Li RF

RESEARCH ARTICLE

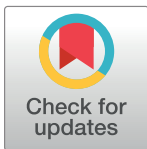
Simvastatin and metformin inhibit cell growth in hepatitis C virus infected cells via mTOR increasing PTEN and autophagy

José A. del Campo^{1☯*}, Marta García-Valdecasas^{2☯}, Antonio Gil-Gómez², Ángela Rojas², Paloma Gallego¹, Javier Ampuero², Rocío Gallego-Durán², Helena Pastor², Lourdes Grande¹, Francisco J. Padillo³, Jordi Muntané³, Manuel Romero-Gómez²

1 Department of Digestive Diseases and CIBERehd, Valme University Hospital, Servicio Andaluz de Salud, Seville, Spain, **2** Department of Digestive Disease, Biomedicine Institute of Seville & CIBERehd, Rocio University Hospital, Seville, Spain, **3** Department of General Surgery, Rocio University Hospital, CSIC and University of Seville, Seville, Spain

☯ These authors contributed equally to this work.

* jantonio.delcampo@ciberehd.org



OPEN ACCESS

Citation: del Campo JA, García-Valdecasas M, Gil-Gómez A, Rojas Á, Gallego P, Ampuero J, et al. (2018) Simvastatin and metformin inhibit cell growth in hepatitis C virus infected cells via mTOR increasing PTEN and autophagy. PLoS ONE 13(1): e0191805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191805>

Editor: Matias A Avila, University of Navarra School of Medicine and Center for Applied Medical Research (CIMA), SPAIN

Received: December 18, 2017

Accepted: January 11, 2018

Published: January 31, 2018

Copyright: © 2018 del Campo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Innovation and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III, grant numbers PI13/01192, PI14/01349, co-funded by European Union (ERDF/ESF, "Investing in your future") and Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection has been related to increased risk of development of hepatocellular carcinoma (HCC) while metformin (M) and statins treatment seemed to protect against HCC development. In this work, we aim to identify the mechanisms by which metformin and simvastatin (S) could protect from liver cancer. Huh7.5 cells were infected with HCV particles and treated with M+S. Human primary hepatocytes were treated with M+S. Treatment with both drugs inhibited Huh7.5 cell growth and HCV infection. In non-infected cells S increased translational controlled tumor protein (TCTP) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) proteins while M inhibited mammalian target of rapamycin (mTOR) and TCTP. Simvastatin and metformin co-administered down-regulated mTOR and TCTP, while PTEN was increased. In cells infected by HCV, mTOR, TCTP, p62 and light chain 3B II (LC3BII) were increased and PTEN was decreased. S+M treatment increased PTEN, p62 and LC3BII in Huh7.5 cells. In human primary hepatocytes, metformin treatment inhibited mTOR and PTEN, but up-regulated p62, LC3BII and Caspase 3. In conclusion, simvastatin and metformin inhibited cell growth and HCV infection *in vitro*. In human hepatocytes, metformin increased cell-death markers. These findings suggest that M+S treatment could be useful in therapeutic prevention of HCV-related hepatocellular carcinoma.

Introduction

The natural history of hepatitis C infection frequently ranges from chronic infection to liver cirrhosis and liver cancer. The majority of HCC occurred on chronic liver diseases or cirrhosis [1]. The proportion of HCC caused by the HCV ranges from 50% to 70% in developed countries, depending on the prevalence of HCV-related cirrhosis [2]. In addition, HCV-related HCC was significantly related to poor survival [3]. Hepatitis C virus interacts with lipid

0892-2012). JA Del Campo was supported by Nicolás Monardes Program from Servicio Andaluz de Salud (SAS).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

metabolism affecting assembly and virion maturation [4,5]. Statins use resulted in 37% reduction in HCC risk in clinical practice [6]. Moreover, the use of statins increased survival rate in HCC-cirrhotic patients [7]. Statins mechanisms influencing liver cancer development and progression include anti-proliferative, pro-apoptotic, anti-angiogenic, immunomodulatory and anti-infective effects via: a) deregulation of cell cycle regulatory cyclins; b) increase in p19, p21 and p27 proteins; c) inhibition of Myc and AKT/mTOR pathways [6,8].

Metformin use in cirrhotics reduced HCC incidence [9]. This drug activates AMP-activated protein kinase (AMPK) and prevents mTOR phosphorylation [10]. The mTOR pathway is a major tumor-initiating pathway in hepatocellular carcinoma, with up-regulation seen in up to 50% of tumors [11]. Cultured cells treated with metformin showed cell cycle arrest at G0/G1 phase [12] and, in nude mice, this treatment caused xenograft HCC-tumor growth suppression [13].

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) is a tumor suppressor which inhibits mTOR pathway. The most accepted hypothesis supports that HCV infection down-regulates PTEN to activate mTOR [10] and promotes HCC growth [14]. Translational controlled tumor protein (TCTP) has been classified as an oncogene and its effects include an anti-apoptotic role inhibiting BCL2-associated X Protein (Bax), down-regulates p53, induces a faster cell cycle progression which promotes higher mutation rate, and induces cytokines production that promote inflammation [15–17] suggesting TCTP could be a target for anti-cancer drugs.

The aim of the present study was to investigate the mechanisms by which metformin and simvastatin could prevent liver cancer in HCV infection using *in vitro* models based on Huh7.5 and human primary hepatocytes culture.

Methods

Cell culture and human primary hepatocytes

Huh7.5 cells (Apath LLC, New York, USA) were grown in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100U/ml) streptomycin (100µg/ml) antibiotics, L-glutamine and non-essential aminoacids. Cells were incubated at 37°C, 5% CO₂. Infective particles of JFH-1 were added to cell plate at 1 particle/cell, and simvastatin (2µM) (Sigma, San Louis, Missouri, USA) and/or metformin (2mM) (Acofarma, Barcelona, Spain) treatment were added 3 hours after cell seeding, and incubated together for 72 hours. To calculate cell viability, cells were seeded with three different concentrations of metformin (1mM, 2mM and 10mM) or simvastatin (1µM, 2µM and 4µM) over 24, 48 or 72 hours. Cell number and viability were determined using trypan blue test on a Neubauer chamber.

Human hepatocytes were prepared from liver biopsies obtained from 3 donors undergoing surgical resection of a liver tumor. Biopsy sampling was with informed consent of the patient, and the study was approved by the Rocio University Hospital's Ethics Committee and was performed in accordance with approved guidelines. Hepatocytes isolation was based on the two-step collagenase procedure [18]. Cell viability was consistently 85%, as determined by trypan blue exclusion. Hepatocytes (8×10⁶ cells; 150,000 cells/cm²) were pooled and seeded at confluence on type I collagen-coated dishes (Iwaki, Gyouda, Japan) and maintained in a DMEM--Ham-F12: William's E (1:1) supplemented medium for 12 h. The medium was then removed and replaced with a fresh culture medium supplemented, when indicated, with metformin (2mM) or simvastatin (2µM) for 72 hours.

Cell-cycle arrest study

After treatment, Huh7.5 cells were trypsinized and 1×10⁶ cells were washed with PBS and fixed with 70% cold ethanol in PBS at -20°C overnight. After centrifugation (700 × g; 5 min),

cells were resuspended in PBS containing 40 µg/mL PI and 100 µg/mL RNase and incubated for 30 min at 37°C in the dark. Samples were then analyzed on a BD™CantoII flow cytometer (BD Biosciences) using BD FACS Diva6.0 software.

Gene expression assays

Total RNA was extracted from cellular lysates using standard protocols. Reverse transcription reactions were performed using commercially available kits (Qiagen, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Gene expression was analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using an Illumina Eco Real-Time PCR model cyler. *GAPDH*, *RRN18S*, *AKT*, *mTOR*, *PTP1B*, *PTEN*, *TCTP* and *MAPLC3B* primers were purchased from Qiagen (QuantiTect Primer Assays). The presence of JFH-1 RNA in cell cultures was determined by qPCR using specific primers (forward: CTGTGAGGAAGTACTGTCT and reverse: CGCCCTATCAGGC AGTACCA) which targeted negative strand of HCV-RNA. JFH1 particle production in culture medium, was measured by COBAS® Taqman® HCV test v2.0.

Protein analysis

Cells were disrupted using a M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent kit (Thermo SCIENTIFIC) and total proteins were quantified using Bradford Assay. Total proteins (50ug) were used for western-blot analysis, and were loaded onto 10–12% SDS-PAGE (Mini-protein TGX Stain-free gels, BioRad, Hercules, California, USA) with prestained protein standards. Primary antibodies (mTOR, PTP1B, PTEN, TCTP, LC3B, p62, Caspase 3 and β-actin) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and anti-core antibody from Enzo Life Science (Postfach, Lausen, Switzerland). Proteins were detected by chemiluminescence, according to manufacturer's instructions (WesternBright™ ECL, Advansta, Menlo Park, California, USA). Image analysis and quantification was performed using ChemiDoc™ MP Imaging System and ChemiDoc™ XRS+ software (BioRad).

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Continuous variables were defined as means ± SD. Normal distribution was analyzed by Shapiro-Wilks test. Comparisons between groups were made using the Student *t*-test or ANOVA test for continuous and normal variables. Depending on variance homogeneity, Bonferroni or T2 Tamhane correction tests were used. Two-sided P values 0.05 were considered statistically significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Data were entered into a computerized database and analyzed using the SPSS package (SPSS 18.0 for Windows, Chicago, IL).

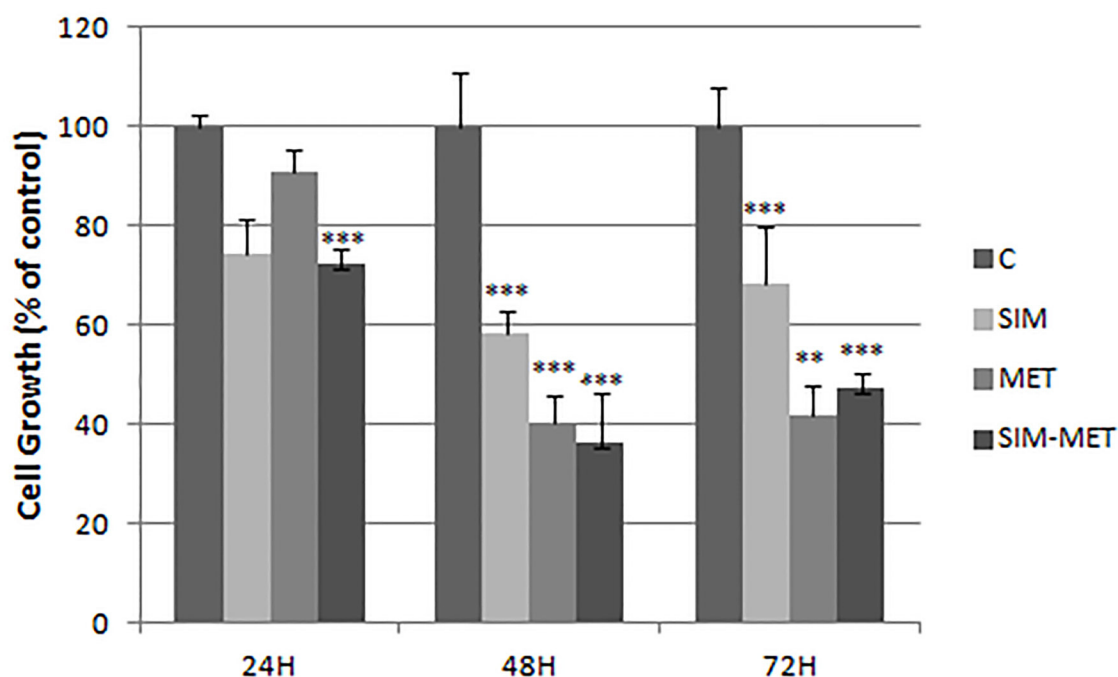
Results

Simvastatin and metformin decreased cell proliferation

Simvastatin and metformin impaired cell proliferation in a dose- and time-dependent manner in Huh7.5 cell (Fig 1a and S1 Fig). Simvastatin (4 µM) inhibited cell growth by $58\% \pm 3.23$ ($p = 0.009$), metformin (10 mM) reduced cell growth by $84\% \pm 2.5$ compared to vehicle treated cells after 72h treatment ($p < 0.001$) (S1 Fig). Metformin (2mM) + simvastatin (2µM) combination did not increase inhibition rate compared to separated treatment ($63\% \pm 3.24$). For the remaining experiments, metformin 2 mM and simvastatin 2 µM were chosen.

To investigate the mechanisms responsible for cell growth inhibition FACS analysis was performed on propidium iodide stained cells to determine the effects of these drugs on cell cycle progression. As shown in Fig 1b, after simvastatin and metformin treatment for 72 hours

a.



b.

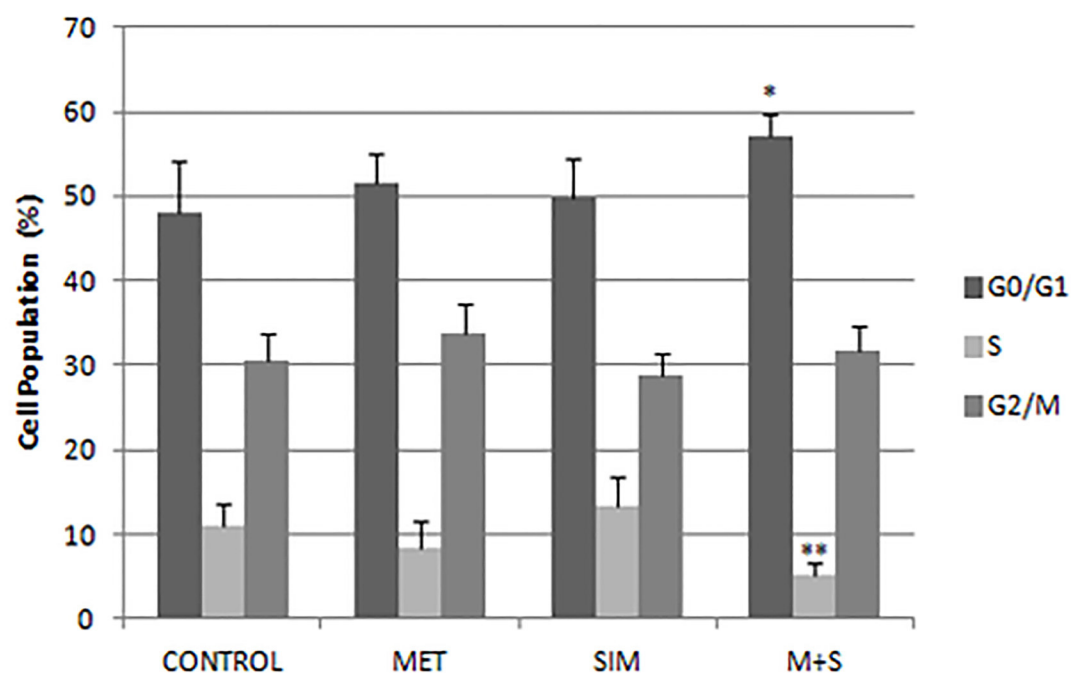


Fig 1. Cell viability of Huh7.5 cells treated with simvastatin and metformin. A: Percentage of cell kinetic in Huh7.5 treated with metformin (M), simvastatin (S) or combination (S: 2 μ M, M: 2mM). Cell number was quantified by Neubauer chamber. B: Percentage of Huh7.5 cell treated with these treatments in different phases of cell cycle measured by FACS analysis. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191805.g001>

the highest percentage of cells was found in the G0/G1 phase (+9.2% more cells in G0/G1 phase) while cells in S-phase decreased significantly (-4.56%), with no significant change in number of cells in G2/M phase (+1.36%).

Metformin and simvastatin modified PTEN and TCTP expression

In Huh7.5 cells treated with simvastatin (2 μ M) for 72h we detected increased tyrosine phosphatase1B (*PTP1B*) gene expression (1.5 ± 0.2 , $p = 0.047$) (Fig 2a). Metformin (2mM) treatment

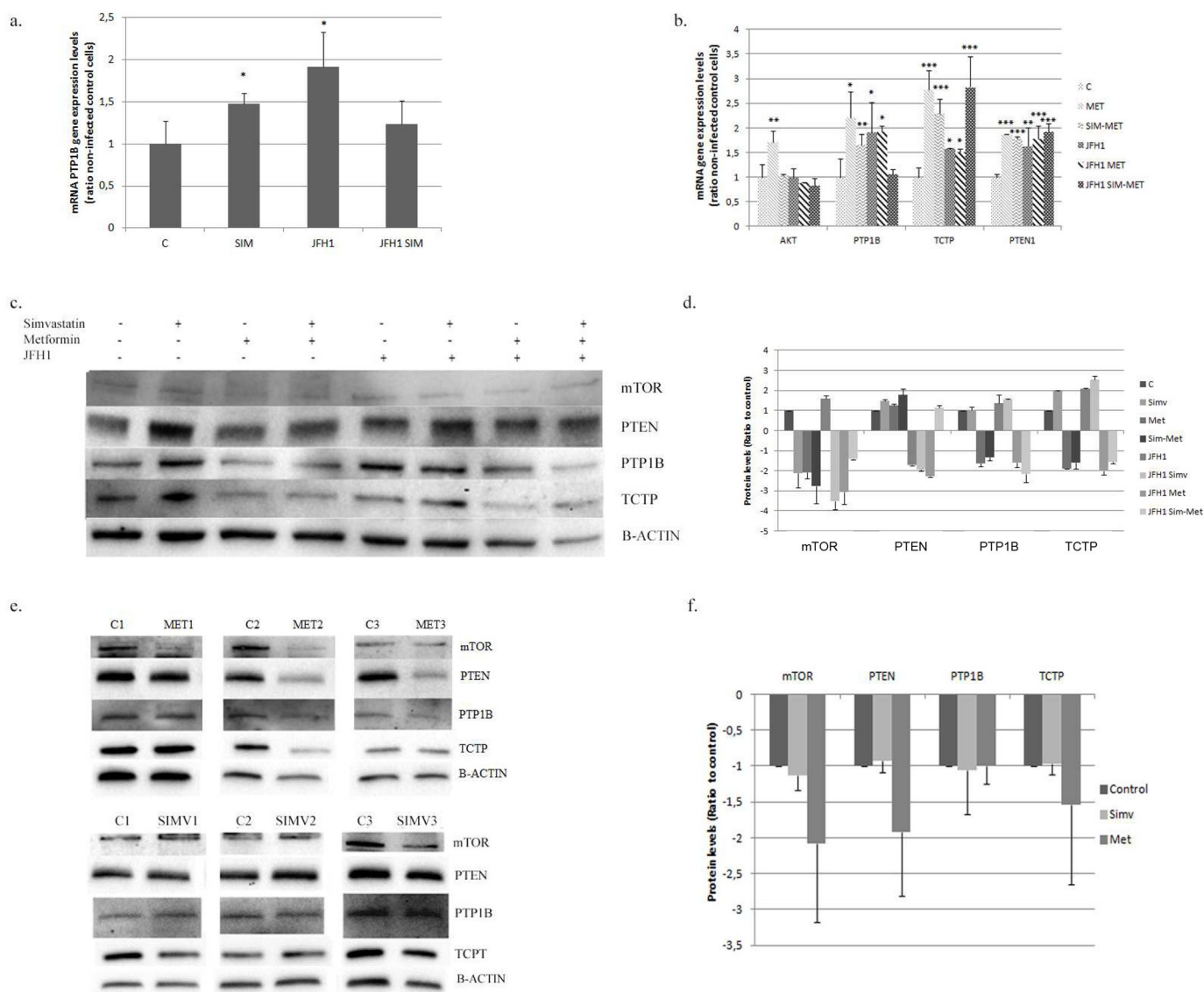


Fig 2. mTOR pathway modification in Huh7.5 cell and in primary hepatocytes. A: PTP1B gene expression in Huh7.5 cells infected with JFH1 particles (1 particle/cell) and treated 24 hours post-infection with simvastatin (S: 2 μ M) alone or in combination with metformin (SIM-MET; S: 2 μ M, M: 2mM). B: Gene expression of mTOR pathway in Huh7.5 cells infected with JFH1 particles and treated at 24 hours post-infection with metformin (M: 2mM) alone or in combination with simvastatin. C: Protein expression by western-blot of mTOR pathway in control or JFH1 infected in Huh 7.5 cells treated with simvastatin (SIM; 2 μ M), metformin (MET; 2mM) or in combination (SIM-MET; S: 2 μ M, M: 2mM) over 72 hours. All gels have been run under the same experimental conditions. D: Protein quantification of Huh7.5 using ChemiDoc™ MP Imaging System. E: Protein expression of the mTOR pathway in human primary hepatocytes treated with simvastatin (2 μ M) or metformin (2mM) quantified by western-blot of three different donors. F: Protein quantification of human primary hepatocytes using ChemiDoc™ MP Imaging System. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191805.g002>

increased *AKT* (1.9 ± 0.2), *PTEN1* (1.9 ± 0.06), *PTP1B* (2.2 ± 0.5) and *TCTP* (2.8 ± 0.4) gene expression (Fig 2b). PTEN and TCTP protein expression were increased after simvastatin treatment (1.5 ± 0.05 and 1.9 ± 0.03 -fold induction, respectively) while mTOR was inhibited 2.1 ± 0.7 fold (Fig 2c and 2d). Metformin treatment down-regulated mTOR, PTP1B and TCTP protein expression (2.1 ± 0.3 ; 1.64 ± 0.2 ; and 1.9 ± 0.02 -fold inhibition, respectively) (Fig 2c and 2d).

Huh7.5 cells treated with simvastatin plus metformin showed induced gene expression of *PTP1B* (1.7 ± 0.03 fold) *TCTP* (2.3 ± 0.21 fold) and *PTEN1* (1.8 ± 0.04 fold) (Fig 2b). The combination of both drugs decreased mTOR and TCTP protein expression (1.7 ± 0.8 ; 1.6 ± 0.2 fold inhibition, respectively) while PTEN was found increased (1.7 ± 0.3) (Fig 2c and 2d).

Simvastatin had no significant effect on protein abundance in primary hepatocytes (Fig 2e and 2f). However, metformin down-regulated mTOR and PTEN protein levels (2.6 ± 0.8 and 2.3 ± 0.8 -fold inhibition, respectively) (Fig 2e and 2f).

HCV infection regulates PTEN, mTOR and TCTP

HCV infection increased gene expression of *PTP1B* (1.9 ± 0.6), *PTEN1* (1.6 ± 0.4) and *TCTP* (1.6 ± 0.02) fold induction (Fig 2a and 2b). Moreover, TCTP and mTOR protein expression were also increased (2.1 ± 0.3 and 1.6 ± 0.13 -fold induction, respectively), while PTEN was decreased (1.7 ± 0.04 -fold inhibition) (Fig 2c and 2d).

Huh7.5 infected cells treated with simvastatin ($2 \mu\text{M}$) showed no significant changes in gene expression compared to control (non-infected). However, protein expression was significantly modified: TCTP was increased 2.8 ± 0.2 fold while mTOR and PTP1B were down-regulated (3.5 ± 0.4 and 1.6 ± 0.05 -fold inhibition, respectively) (Fig 2c and 2d).

Metformin down-regulated *TCTP* gene expression in infected cells ($p = 0.006$) (Fig 2b). Moreover, in infected cells, metformin also down-regulated TCTP, PTP1B, PTEN and mTOR protein expression.

In Huh7.5 infected cells, simvastatin + metformin treatment decreased *PTP1B* gene expression and increased *TCTP* (Fig 2b). Regarding protein expression, a significant inhibition of mTOR, TCTP and PTP1B was found (1.5 ± 0.1 ; 1.6 ± 0.04 and 2.1 ± 0.4 -fold inhibition), while PTEN1 was increased (1.2 ± 0.1 fold), indicating a protective role (Fig 2c and 2d).

Simvastatin and metformin inhibited HCV infection *in vitro*

HCV replication in Huh7.5 cells was hampered by metformin (2 mM), simvastatin ($2 \mu\text{M}$) and the combination of both drugs (Fig 3a). This effect was also found when measuring extracellular levels of HCV-RNA (Fig 3b). Metformin decreased core protein expression by 38.5 ± 3.5 fold (Fig 3d). Simvastatin also down-regulated core protein expression (3.1 ± 1.7 -fold inhibition). Metformin treatment in HCV-RNA (up to 87.3 ± 8.8 inhibition rate) and core protein levels (60.0 ± 10.0 -fold inhibition) (Fig 3a, 3c and 3d). No significant changes were observed when comparing the effect of metformin alone or in combination with simvastatin in extracellular HCV-RNA down-regulation (Metformin: 21.4 ± 1.8 , metformin+simvastatin: 22.4 ± 3.9) (Fig 2b).

Metformin treatment activates LC3B and procaspase 3

To analyze the effect of metformin on autophagy markers, we have evaluated changes in gene and protein expression in both, Huh7.5 cells and human primary hepatocytes. Light Chain 3B (LC3B) and Sequestosome 1 (p62) proteins are involved in autophagy. HCV infection induced *MAPLC3B* gene expression (1.7 ± 0.1 fold) (Fig 4a) as well as protein expression of p62 and LC3BII (2.2 ± 1.4 and 3.7 ± 0.2 -fold induction, respectively) (Fig 4b and 4d).

Huh7.5 cells treated with metformin (2 mM) induced *MAPLC3B* gene expression (*MAPLC3B*: 2.0 ± 0.03 -fold) (Fig 4a). The expression of LC3BI and LC3BII were not modified, but p62 was

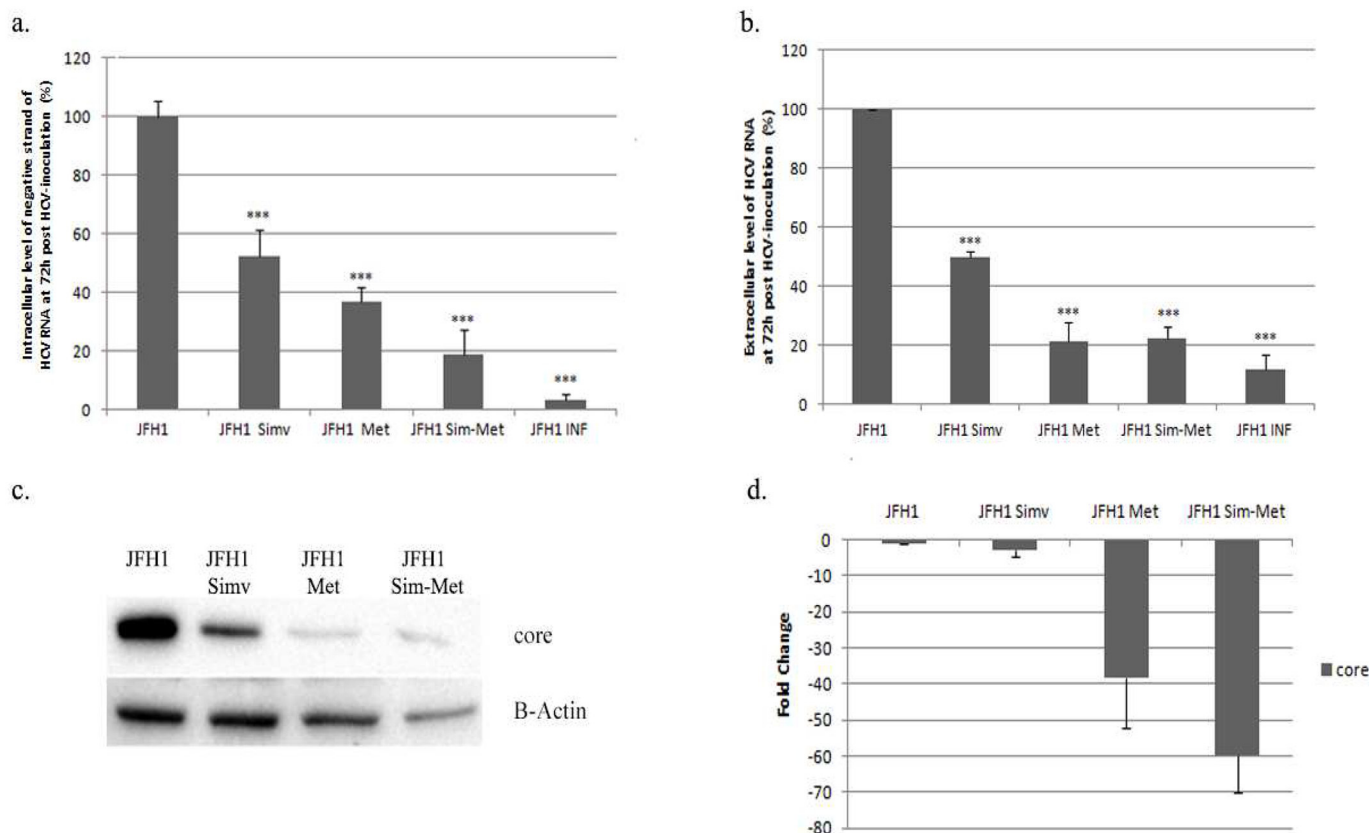


Fig 3. Metformin and simvastatin effects on HCV infection. **a.** Intracellular levels of negative strand of HCV RNA (%) in Huh7.5 cells infected with JFH1 and treated with simvastatin (SIM; 2μM), metformin (MET; 2mM) or in combination (SIM-MET; S: 2μM, M: 2mM), relative to complete infection (100% without any treatment). α -Interferon (500 IU/ml) was used as a positive control. **b.** Extracellular level of HCV RNA (%) measure in supernatant from Huh7.5 culture cells treated with simvastatin and metformin quantified by COBAS[®] Taqman[®] HCV test v2.0. **c.** core protein expression in Huh7.5 cells treated with simvastatin (2μM) or metformin (2mM) quantified by western-blot. **d.** core protein quantification using ChemiDoc[™] MP Imaging System. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191805.g003>

found increased (2.1 ± 0.4 fold) (Fig 4b and 4d). In infected cells (JFH-1) the effect of metformin treatment was more pronounced (p62: 3.3 ± 0.9 , LC3BI: 1.6 ± 0.2 and LC3BII: $+6.0 \pm 3.6$ -fold induction) (Fig 4b and 4d).

We tested whether metformin + simvastatin combination could have an effect in autophagy markers. Huh7.5 (mock and infected cells) were treated with these drugs and *MAPLC3B* gene expression was found up-regulated, regardless the presence of JFH1 particles (Fig 4a). LC3BI, LC3BII and p62 proteins were found up-regulated (3.7 ± 0.5 ; 2.1 ± 0.2 ; 4.9 ± 3.8 -fold change, respectively) (Fig 4b and 4d). We performed the same analysis in human primary hepatocytes, where simvastatin had no significant effect on these proteins (Fig 4a). However, metformin treatment increased p62 ($+1.70 \pm 0.5$); LC3BII ($+5.6 \pm 4.2$) and the activated protein caspase3 (4.1 ± 2.5 -fold induction) (Fig 4c and 4e), indicating autophagy events.

Metformin (5 and 10 mM) down-regulated p62 expression. This effect was not observed using lower concentration (2 mM) (Fig 4f).

Discussion

In this work, we have shown that metformin and simvastatin in combination decreased hepatoma cell proliferation arresting cell cycle in G0/G1, inhibited TCTP and mTOR pathway,

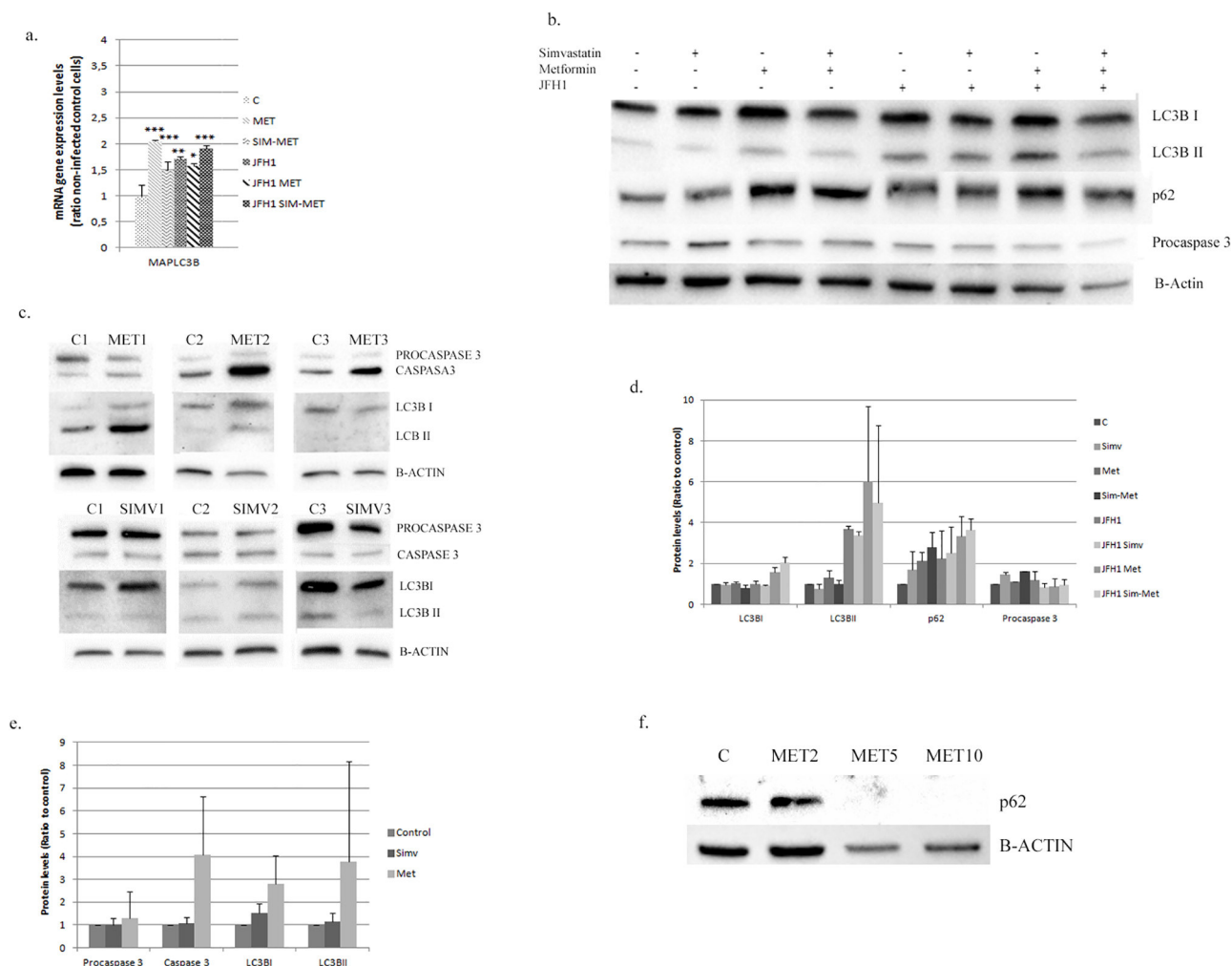


Fig 4. Autophagy modification in Huh7.5 cell and in primary hepatocytes. A: MAPLC3B gene expression in Huh7.5 cells infected with JFH1 particles (1 particle/cell) and treated 24 hours post-infection with metformin (M: 2mM) alone or in combination with simvastatin (SIM-MET; S:2μM, M: 2mM). B: Western-blot analysis of autophagy markers in control or JFH1 infected in Huh 7.5 cells treated with simvastatin (SIM; 2μM), metformin (MET; 2mM) or in combination (SIM-MET; S:2μM, M: 2mM) over 72 hours. All gels have been run under the same experimental conditions. C: Protein expression of autophagy markers in human primary hepatocytes treated with simvastatin (2μM) or metformin (2mM) quantified by western-blot of three different donors. D: Protein quantification of Huh7.5 using ChemiDoc™ MP Imaging System. E: Protein quantification of human primary hepatocytes using ChemiDoc™ MP Imaging System. F: p62 protein expressions in Huh7.5 cells treated with three different concentration of metformin (M2: 2mM, M5: 5mM and M10: 10mM). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191805.g004>

increased tumor suppressor PTEN and promoted autophagy in Huh7.5 cells infected by HCV or non-infected and in primary hepatocytes, suggesting that these drugs should be tested as a chemo-preventive option in HCC.

Our data demonstrated that cell growth was significantly decreased with simvastatin and metformin. Singh *et al.* have previously described an inhibition of cell proliferation with simvastatin treatment in Huh7 and HepG2 cells(8). Similar results have been obtained with metformin treatment alone [19]. In prostate cancer a synergic reduction of cell viability and an increase in G0/G1 phase was observed in metformin+simvastatin patients [20,21]. In our study, the combination of these drugs at 72h arrested cell cycle in G0/G1 phase, decreasing also cells in S phase. However, this combination failed to inhibit cell growth more than metformin alone at 48h.

A recent meta-analysis reported that the use of metformin reduced the ratio of liver cancer by 48%(22). A subgroup adjusted for the use of statins, showed a reduction in HCC incidence rate (OR = 0.75; 95% CI, 0.68–0.83; $P < 0.001$), suggesting a synergistic effect of metformin and statins for liver cancer [22]. The increased cell number in G0/G1 phase and the cell reduction in S phase could be an explanation of these results.

MTOR plays an important role in HCC [11]. Metformin decreases mTOR expression through AMPK activation. Statins also inhibited mTOR in several tissues [23] as we observed in Huh7.5 cells, albeit this effect was not observed in primary hepatocytes. The role of statins on mTOR-Akt pathway was pointed out by Roudier et al. [24] through the inhibition of Akt phosphorylation mediated by p53. Indeed, Huh7 cell lines harbor a mutated version of p53 protein [25].

Loss or down-regulation of PTEN expression leads to the activation of AKT/mTOR pathway promoting malignant progression [26]. Metformin down-regulates PTEN and enhances Protein kinase- β phosphorylation (AKT/PKB) [27]. However, we observed that simvastatin increases PTEN expression, alone or in combination with metformin. Up-regulation of PTEN with statins has been reported in breast cancer [28]. Others *in vitro* studies demonstrated that PTEN over-expression was able to reduce tumor proliferation in HepG2 [29], indicating a protective role for PTEN.

Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is an inhibitor that regulates phosphorylation levels of tyrosine kinase receptors [30]. The effect of PTP1B levels in tumor tissues has been controversial; in breast, colon and prostate cancer, tumor progression was promoted. In contrast, in esophageal cancer and lymphoma, tumor suppression has been reported [31]. In HCC, PTP1B seems to act as a tumor suppressor because it is down-regulated in tumors, while low PTP1B expression is associated with poor prognosis [30]. In our study, metformin inhibited PTP1B expression in Huh7.5 cells, but did not in primary hepatocytes or in combination with simvastatin.

TCTP is a pro-survival factor over-expressed in HCC. An increased TCTP is significantly associated with advanced HCC, and is an independent marker of poor prognosis [32]. TCTP plays an anti-apoptotic role, as an antagonist of pro-apoptotic Bax [17]. Lower TCTP levels reduce cell viability [33]. In this study, metformin (also in combination with simvastatin) inhibited TCTP in Huh7.5 cells and human primary hepatocytes (Fig 2c and 2e). These interesting data suggest that M + S should be considered for therapy in HCC.

HCV promotes HCC by several pathways. In our study, TCTP and mTOR were increased and PTEN was reduced. However, when infected cells were treated with M + S the opposite situation was found: TCTP/mTOR were down-regulated and PTEN was induced (Fig 2c and 2d). Peng et al. showed that mTOR pathway is upregulated by HCV NS5A to block apoptosis [34], and Peyrou et al. showed a PTEN inhibition by core protein genotype 3 [35]. Our data have shown that M+S treatment could reverse the scenario where HCV infection. We have previously reported that metformin inhibits viral replication [36]. Simvastatin also decreased viral infection as previously reported by Amemiya et al [37]. Metformin plus simvastatin combination yielded the highest level of viral infection inhibition (by 80% of viral replication) (Fig 3).

HCV infection induced autophagosome accumulation, but did not improve protein degradation in liver biopsies [38]. Autophagy regulates higher cholesterol level produced in HCV-infected cells, since hepatocytes have low cytoplasmic lipase levels. In genotype 3, it appears to be an inverse correlation between LC3BII/LC3BI ratio (an indicator of autophagy events), and the presence of microvesicular steatosis. This suggests that agents potentiating autophagy could prevent lipid accumulation in HCV patients [39]. Our results indicate an increased LC3BII in infected cells, but further induction of LC3B I and II was achieved with metformin alone or in combination with simvastatin. In an *in vitro* model of hepatocyte

steatosis, a dysfunctional autophagy was induced and metformin treatment restored this process [40]. Metformin could serve as a pro-autophagic drug through activation of this process via mTOR inhibition [41] and increasing p53 [42]; an inhibitor and an activator of autophagy, respectively.

Autophagy is an adaptive pro-survival program under cellular starvation but, under continual cellular stress, autophagy could be a cell killing response process promoting autophagy cell death (also known as type II programmed cell death) [43]. The less aggressive HCC cell lines and tissues have much higher autophagy levels than the more aggressive HCC cell lines or tissues with recurrent disease [44]. Metformin treatment in primary hepatocytes induced caspase 3 as well as LC3BII—a primary marker for autophagy—. This effect has also been demonstrated in melanoma, colon and endometrial cancer [45]. In our study, p62 is found increased after metformin treatment (2 mM), indicating a blockade of the autophagy flux. However, Takahashi et al. observed that higher metformin concentration (5 and 10 mM) suppressed cancer cell growth via cell cycle arrest and complete autophagy [45]. We have found that higher metformin concentration (5 and 10 mM) decreased p62 protein levels (Fig 4f), indicating that previous autophagy flux blockade could be reversed by higher metformin concentration. Since no caspase activation was detected by metformin treatment, we can rule out that cell growth inhibition promoted by this drug in Huh7.5 cells can be due to cell cycle arrest in G0/G1 phase.

Conclusions

In conclusion, our results showed that metformin + simvastatin combination inhibited HCV infection by reducing RNA negative strand and core protein. This treatment yields lower viral particles production, as well as cell viability inhibition by arresting cell cycle and down-regulating different oncogenic pathways. Metformin treatment inhibited mTOR pathway and the anti-apoptotic protein TCTP, while simvastatin increased the tumor suppressor PTEN. In addition, metformin treatment appears to enhance autophagy processes (probably in a dose-dependent manner) promoting cell growth inhibition. Taking into consideration all the results obtained, we propose that S+M therapy should be considered for patients with high risk of HCC development.

Supporting information

S1 Fig. Cell viability of Huh7.5 cells treated with simvastatin, metformin, or both. A:

Huh7.5 cells were treated with different concentrations of simvastatin (S1: 1μM, S2: 2μM, S3: 4μM) for 72 hours, and cell number quantified by Neubauer chamber; B: Cell viability kinetic in cells treated with metformin (M1: 0.5mM, M2: 2mM, M3:10mM).

(TIF)

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Innovation and Competitiveness, *Instituto de Salud Carlos III*, grant numbers PI13/01192, PI14/01349 co-funded by European Union (ERDF/ESF, “Investing in your future”) and Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0892-2012). JA Del Campo supported by *Nicolás Monardes Program* from Servicio Andaluz de Salud (SAS).

Author Contributions

Conceptualization: José A. del Campo.

Data curation: Marta García-Valdecasas.

Formal analysis: José A. del Campo.

Funding acquisition: José A. del Campo.

Investigation: José A. del Campo, Javier Ampuero, Lourdes Grande, Francisco J. Padillo, Jordi Muntané.

Methodology: Marta García-Valdecasas, Antonio Gil-Gómez, Ángela Rojas, Paloma Gallego, Rocío Gallego-Durán, Helena Pastor, Francisco J. Padillo, Jordi Muntané.

Supervision: José A. del Campo.

Writing – original draft: José A. del Campo, Manuel Romero-Gómez.

Writing – review & editing: José A. del Campo, Manuel Romero-Gómez.

References

1. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology*. 2004.
2. Wang Z, Jin W, Jin H, Wang X. mTOR in Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Function and Treatment. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:1–9.
3. Shindoh J, Hashimoto M, Watanabe G. Surgical approach for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2015; 7(1):70–7. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i1.70> PMID: 25624998
4. Popescu C-I, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)*. 2014; 3(4):892–921.
5. Xiang Y, Tang J-J, Tao W, Cao X, Song B-L, Zhong J. Identification of Cholesterol 25-Hydroxylase as a Novel Host Restriction Factor and a Part of the Primary Innate Immune Responses against Hepatitis C Virus Infection. Diamond MS, editor. *J Virol*. 2015; 89(13):6805–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.00587-15> PMID: 25903345
6. Ampuero J, Romero-Gomez M. Prevention of hepatocellular carcinoma by correction of metabolic abnormalities: Role of statins and metformin. *World J Hepatol*. 2015; 7(8):1105–11. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i8.1105> PMID: 26052399
7. Simon TG, Bonilla H, Yan P, Chung RT, Butt AA. Atorvastatin and fluvastatin are associated with dose-dependent reductions in cirrhosis and hepatocellular carcinoma, among patients with hepatitis C virus: Results from ERCHIVES. *Hepatology*. 2016; 64(1):47–57. <https://doi.org/10.1002/hep.28506> PMID: 26891205
8. Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2013; 144(2):323–32. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.005> PMID: 23063971
9. Romero-Gómez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology*. 2005; 128(3):636–41. PMID: 15765399
10. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang X-M, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014; 510(7506):542–6. <https://doi.org/10.1038/nature13270> PMID: 24847880
11. Bhat M, Sonenberg N, Gores GJ. The mTOR pathway in hepatic malignancies. *Hepatology*. 2013; 58(2):810–8. <https://doi.org/10.1002/hep.26323> PMID: 23408390
12. CAI X, HU X, CAI B, WANG Q, LI Y, TAN X, et al. Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2013; 30(5):2449–57. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2718> PMID: 24008375
13. Cheng J, Huang T, Li Y, Guo Y, Zhu Y, Wang Q, et al. AMP-Activated Protein Kinase Suppresses the In Vitro and In Vivo Proliferation of Hepatocellular Carcinoma. Papa S, editor. *PLoS One*. 2014; 9(4): e93256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093256> PMID: 24709998
14. Gao T, Qin Z, Ren H, Zhao P, Qi Z. Inhibition of IRS-1 by hepatitis C virus infection leads to insulin resistance in a PTEN-dependent manner. *Virol J*. 2015; 12(1):12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645159>

15. Susini L, Besse S, Duflaut D, Lespagnol A, Beekman C, Fiucci G, et al. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ*. 2008; 15(8):1211–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.18> PMID: 18274553
16. Rho SB, Lee JH, Park MS, Byun H-J, Kang S, Seo S-S, et al. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 2011; 585(1):29–35. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.014> PMID: 21081126
17. Acunzo J, Baylot V, So A, Rocchi P. TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treat Rev*. 2014; 40(6):760–9. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.02.007> PMID: 24650927
18. Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin J-C, Maurel P. Human Hepatocyte Culture. In: *Cytochrome P450 Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2006. p. 283–94.
19. Saito T, Chiba T, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Koide S, et al. Metformin, a diabetes drug, eliminates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2013; 8(7):e70010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070010> PMID: 23922888
20. Babcook MA, Shukla S, Fu P, Vazquez EJ, Puchowicz MA, Molter JP, et al. Synergistic Simvastatin and Metformin Combination Chemotherapy for Osseous Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014; 13(10):2288–302. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0451> PMID: 25122066
21. Babcook MA, Sramkoski RM, Fujioka H, Daneshgari F, Almasan A, Shukla S, et al. Combination simvastatin and metformin induces G1-phase cell cycle arrest and Ripk1- and Ripk3-dependent necrosis in C4-2B osseous metastatic castration-resistant prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 2014; 5(11):e1536.
22. Ma S, Zheng Y, Xiao Y, Zhou P, Tan H. Meta-analysis of studies using metformin as a reducer for liver cancer risk in diabetic patients. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(19):e6888.
23. Fang Z, Tang Y, Fang J, Zhou Z, Xing Z, Guo Z, et al. Simvastatin Inhibits Renal Cancer Cell Growth and Metastasis via AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 Pathway. Zhou Z, editor. *PLoS One*. 2013; 8(5):e62823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062823> PMID: 23690956
24. Roudier E, Mistafa O, Stenius U. Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5:2706–15. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0352> PMID: 17121917
25. Hailfinger S, Jaworski M, Marx-Stoelting P, Wanke I, Schwarz M. Regulation of P53 stability in p53 mutated human and mouse hepatoma cells. *Int J Cancer*. 2007; 120(7):1459–64. <https://doi.org/10.1002/ijc.22519> PMID: 17205518
26. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13(5):283–96. <https://doi.org/10.1038/nrm3330> PMID: 22473468
27. Lee SK, Lee JO, Kim JH, Kim SJ, You GY, Moon JW, et al. Metformin sensitizes insulin signaling through AMPK-mediated pten down-regulation in preadipocyte 3T3-L1 cells. *J Cell Biochem*. 2011; 112(5):1259–67. <https://doi.org/10.1002/jcb.23000> PMID: 21465524
28. Teresi RE, Planchon SM, Waite KA, Eng C. Regulation of the PTEN promoter by statins and SREBP. *Hum Mol Genet*. 2007; 17(7):919–28. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm364> PMID: 18065496
29. Tian T, Nan K-J, Guo H, Wang W-J, Ruan Z-P, Wang S-H, et al. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway. *Oncol Rep*. 2010; 23(6):1593–600. PMID: 20428814
30. Zheng L-Y, Zhou D-X, Lu J, Zhang W-J, Zou D-J. Down-regulated expression of the protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is associated with aggressive clinicopathologic features and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 420(3):680–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.066> PMID: 22450318
31. Liu H, Wu Y, Zhu S, Liang W, Wang Z, Wang Y, et al. PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2015; 359(2):218–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.020> PMID: 25617799
32. Chan THM, Chen L, Liu M, Hu L, Zheng B, Poon VK-M, et al. Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development. *Hepatology*. 2012; 55(2):491–505. <https://doi.org/10.1002/hep.24709> PMID: 21953552
33. Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, et al. Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(23):14976–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.222470799> PMID: 12399545
34. Peng L, Liang D, Tong W, Li J, Yuan Z. Hepatitis C Virus NS5A Activates the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway, Contributing to Cell Survival by Disrupting the Interaction between FK506-binding Protein 38 (FKBP38) and mTOR. *J Biol Chem*. 2010; 285(27):20870–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112045> PMID: 20439463

35. Peyrou M, Clément S, Maier C, Bourgoin L, Branche E, Conzelmann S, et al. PTEN protein phosphatase activity regulates hepatitis C virus secretion through modulation of cholesterol metabolism. *J Hepatol*. 2013; 59(3):420–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.012> PMID: 23623999
36. Del Campo JA, García-Valdecasas M, Rojas L, Rojas Á, Romero-Gómez M. The Hepatitis C Virus Modulates Insulin Signaling Pathway In Vitro Promoting Insulin Resistance. Meurs EF, editor. *PLoS One*. 2012; 7(10):e47904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047904> PMID: 23133528
37. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, et al. Targeting Lipid Metabolism in the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis*. 2008; 197(3):361–70. <https://doi.org/10.1086/525287> PMID: 18248300
38. Sir D, Chen W, Choi J, Wakita T, Yen TSB, Ou JJ. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008; 48(4):1054–61. <https://doi.org/10.1002/hep.22464> PMID: 18688877
39. Vescovo T, Romagnoli A, Basulto Perdomo A, Corazzari M, Ciccocanti F, Alonzi T, et al. Autophagy Protects Cells From HCV-Induced Defects in Lipid Metabolism. *YGASt*. 2012; 142:644–653.e3.
40. Song YM, Lee Y, Kim J-W, Ham D-S, Kang E-S, Cha BS, et al. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy*. 2015; 11(1):46–59. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984271> PMID: 25484077
41. Aldea M, Craciun L, Tomuleasa C, Berindan-Neagoe I, Kacso G, Florian IS, et al. Repositioning metformin in cancer: genetics, drug targets, and new ways of delivery. *Tumor Biol*. 2014; 35(6):5101–10.
42. Malki A, Youssef A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling. *Oncol Res*. 2011; 19(6):275–85. PMID: 21776823
43. Yang D, Li L, Liu H, Wu L, Luo Z, Li H, et al. Induction of autophagy and senescence by knockdown of ROC1 E3 ubiquitin ligase to suppress the growth of liver cancer cells. *Cell Death Differ*. 2013; 20(2):235–47. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.113> PMID: 22935614
44. Rautou P-E, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol*. 2010; 53(6):1123–34. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.006> PMID: 20810185
45. Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, Takebayashi A, Kita N, Takahashi K, et al. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int*. 2014; 14(1):53.



Natural Extracts Abolished Lipid Accumulation in Cells Harboursing non-favourable *PNPLA3* genotype

Ángela Rojas,* Paloma Gallego,** Antonio Gil-Gómez,* Rocío Muñoz-Hernández,* Lourdes Rojas,* Rosario Maldonado,**
Rocío Gallego-Durán,* Marta García-Valdecasas,* José A. Del Campo,****** Juan D. Bautista,** Manuel Romero-Gómez*

* Laboratorio de Investigación clínica y traslacional en enfermedades hepáticas y digestivas y CIBERehd. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

** UGC de enfermedades hepáticas y digestivas, CIBERehd. Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain.

*** Unidad de Farmacología Clínica y Experimental. Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain.

**** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

ABSTRACT

Background & aims. G-allele of *PNPLA3* (rs738409) favours triglycerides accumulation and steatosis. In this study, we examined the effect of quercetin and natural extracts from mushroom and artichoke on reducing lipid accumulation in hepatic cells.

Material and methods. Huh7.5 cells were exposed to oleic acid (OA) and treated with quercetin and extracts to observe the lipid accumulation, the intracellular-TG concentration and the LD size. Sterol regulatory element binding proteins-1 (*SREBP-1*), peroxisome proliferator-activated receptor (*PPAR α - γ*) and cholesterol acyltransferase (*ACAT*) gene expression levels were analysed.

Results. Quercetin decreased the intracellular lipids, LD size and the levels of intracellular-TG through the down-regulation of *SREBP-1c*, *PPAR γ* and *ACAT1* increasing *PPAR α* . The natural-extracts suppressed OA-induced lipid accumulation and the intracellular-TG. They down-regulate the hepatic lipogenesis through *SREBP-1c*, besides the activation of lipolysis through the increasing of *PPAR α* expression. **Conclusions.** Quercetin and the aqueous extracts decrease intracellular lipid accumulation by down-regulation of lipogenesis and up-regulation of lipolysis.

Key words. Steatosis. Lipid droplets. Triglycerides. Quercetin. *Cynara scolymus*. *Agaricus Bisporus*. Mushroom. Artichoke.

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as the accumulation of excessive fat in the liver in the absence of excessive drinking of alcohol.¹ It has been included as a metabolic abnormality such as obesity, type 2 diabetes, arterial hypertension, and hypertriglyceridemia.^{2,3} NAFLD encompasses a wide spectrum of liver damage ranging from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), advanced fibrosis, and rarely, progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.⁴

Hepatic steatosis can either be a benign, non-inflammatory condition, or can be associated with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The earliest stage is characterized by the excessive triglycerides (TGs) accumulation as lipid droplets (LDs) in the cytoplasm of hepatocytes. Hepatic steatosis is often self-limited, however it can progress to NASH, which is known by the presence of hepatocyte in-

jury (hepatocyte ballooning and cell death), inflammatory infiltrate, and/or collagen deposition (fibrosis).⁵ It has been postulated that the inhibition of excessive lipid synthesis and uptake could be an effective intervention for NASH.^{6,7}

Dietary fat is one of the most important environmental factors associated with the incidence of NAFLD. The search of functional food ingredients such as herbal extracts or flavonoids capable to suppress the accumulation of hepatic lipid⁸⁻¹² by the modulation of several pathways is ongoing. Several polyphenols and phenolic compounds, such anthocyanins, curcumin, resveratrol, silymarin and those present in coffee and tea have been proposed as NAFLD treatment but the varying bioavailability remains poor, so further studies are needed for the future clinical applications.¹³

Steatosis could be modulated by genetic susceptibility.¹⁴ In 2008, Romeo, *et al.* performed an independent ge-

nome-wide association study to identify genetic determinants of liver steatosis.¹⁵ The author figured out that the polymorphism rs738409 C>G in *PNPLA3* gene was robustly associated with an increased risk for hepatic steatosis. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*PNPLA3*) is a transmembrane protein expressed prominently in hepatocytes and the substitution I148M has been suggested to impair TG hydrolysis in hepatocytes, favouring its accumulation.¹⁶ Recently it has been proposed that *PNPLA3*-148M evade ubiquitylation and proteasomal degradation, resulting in the accumulation of *PNPLA3*-148M on the surfaces of lipid droplets impairing TGs mobilization from LDs.¹⁷ The discovery of new drugs to reduce the risk of NAFLD would be useful considering the genetics factors. The purposes of this study were to elucidate the role of quercetin and other water-soluble extracts in an *in-vitro* model with unfavourable genotype GG for *PNPLA3*.¹⁸

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

Huh7.5 cells were routinely cultured in DMEM (ThermoFisher, MA, USA) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in an incubator under an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The Huh7.5 cell model of OA-induced intracellular lipid accumulation was developed as previously described.¹⁹ Cells were cultured with 1mM of Oleic acid for 48 h. Control cells were treated with FFA-free medium containing the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO).

PNPLA3 genotyping

DNA from cells was extracted using the DNA isolation Kit with the MagNA Pure LC Instruments (Roche). The rs738409 SNPs were analysed using the StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, USA) with a Taqman SNP Genotyping Assay, using published sequences from the NCBI Entrez SNP Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) (rs738409: 5'-AAG-GAGGGATAAGGCCACTGTA-3' as forward and 5'-CTTTCACAGGCCTTGGTATGTTC-3' as reverse primer).

Preparation of aqueous extracts

White button mushrooms (*Agaricus bisporus*) were used as raw material after cultivation in a pilot plant at the University of Seville (Spain), according to standard procedures. All chemicals used were of analytical grade. *Agaricus bisporus* Aqueous Extract (*AbAE*) was obtained by an enzy-

matic procedure based on the protocol described by Cremades and colleagues.²⁰ Briefly, after *A. bisporus* homogenization (10g + 10 mL distilled water) and enzymatic digestion with a mixture of glucanase and chitinase enzymes (Novo Nordisk®, Denmark) at pH = 5, temperature 55 °C and an enzyme/substrate ratio of 0.01, for 24 h. Finally, temperature was raised up to 90 °C for 120 min to inactivate the enzymes. After cooling to room temperature, pH was adjusted to 7.0 with 1M NaOH and centrifuged at 8000 x g. The supernatant was collected and filtered through a 0.2 µm membrane, using the filtrate as “crude *AbAE*” for activity assays. *Cynara scolymus* aqueous extracts were obtained by a similar procedure but using a mixture of celluloses and proteases as hydrolytic agent.²⁰

Detection of LDs by Fluorescent Microscopy. Oil Red O (ORO) cell staining.

Neutral lipids stored into the LDs were visualized by fluorescence microscopy using ORO staining (Sigma-Aldrich, MO, USA), a vital lipophilic dye used to label fat accumulation in the cytosol, according to Hu and colleagues.²¹ To analyze fat accumulation 20,000 Huh7.5 cells were seeded and grown on coverslips in 24 wells plate. Huh7.5 cells were cultured in the presence of oleic acid 1mM diluted in DMSO (less than 0.01% of total volume) and treated for 48h with 50 µM of quercetin (HWI ANALYTIK, GmbH, Germany) or 0.1 mg/mL of water-soluble extract from *A. Bisporus* (M) or *Cynara scolymus* (A). The cells were rinsed two times with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10min and permeabilised with 0.2% Triton X-100 for 2 min. Nuclei cells were stained with 46-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 30min at room temperature, and neutral lipids were stained with ORO as previously described.²² Images were acquired with a fluorescence microscope (OLYMPUS BX41) equipped with the standard epifluorescence filter set up for DAPI and FITC. For determination of LD diameter images were captured under oil with a 100x plan apochromat objective. Analyses were performed on three independent experiments measuring at least 100 cells for each treatment using Imaging Software cell ^ F (Olympus, Tokyo, Japan).

Fluorimetric determination of intracellular fat content - Nile red staining

The intracellular fat content was determined fluorimetrically based on Nile Red staining, a vital lipophilic dye used to label fat accumulation in the cytosol.²³ Ten thousand Huh7.5 cells were grown in 96 plate wells, exposed to oleic acid and treated with quercetin and water-soluble M or A for 48 h. AdipoRed™ Reagent (Lonza, Basel, Switzer-

land) was added to each well and incubated at room temperature for 10 min. Intensity fluorescence was quantified using Synergy HT at 485/572 nm (BioTeK, VT, USA) and normalized to protein concentration.

RNA isolation, retro-transcription and quantitative polymerase chain reaction (q-PCR)

Total RNA was extracted from the above-treated cells using the guanidine isothiocyanate method.²⁴ RNA samples were treated with DNaseI. Total RNA was subjected to reverse transcription (RT) using commercially available kits (QuantiTect Rev. Transcription Kit; Qiagen,

Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. *SREBP-1c*, *PPAR γ* , *PPAR α* , *ACAT*, *DGAT-1*, *DGAT-2*, *FASN*, *MTTP*, *APOB* and *APOE* gene expression levels were analysed using commercial oligonucleotides (Qiagen, Hilden, Germany).

Statistical Analysis

Continuous variables are described as means \pm SD of minimum three independent experiments. The Student t-test was used for comparisons between groups. P values $P < 0.05$ (*) $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered statistically significant.

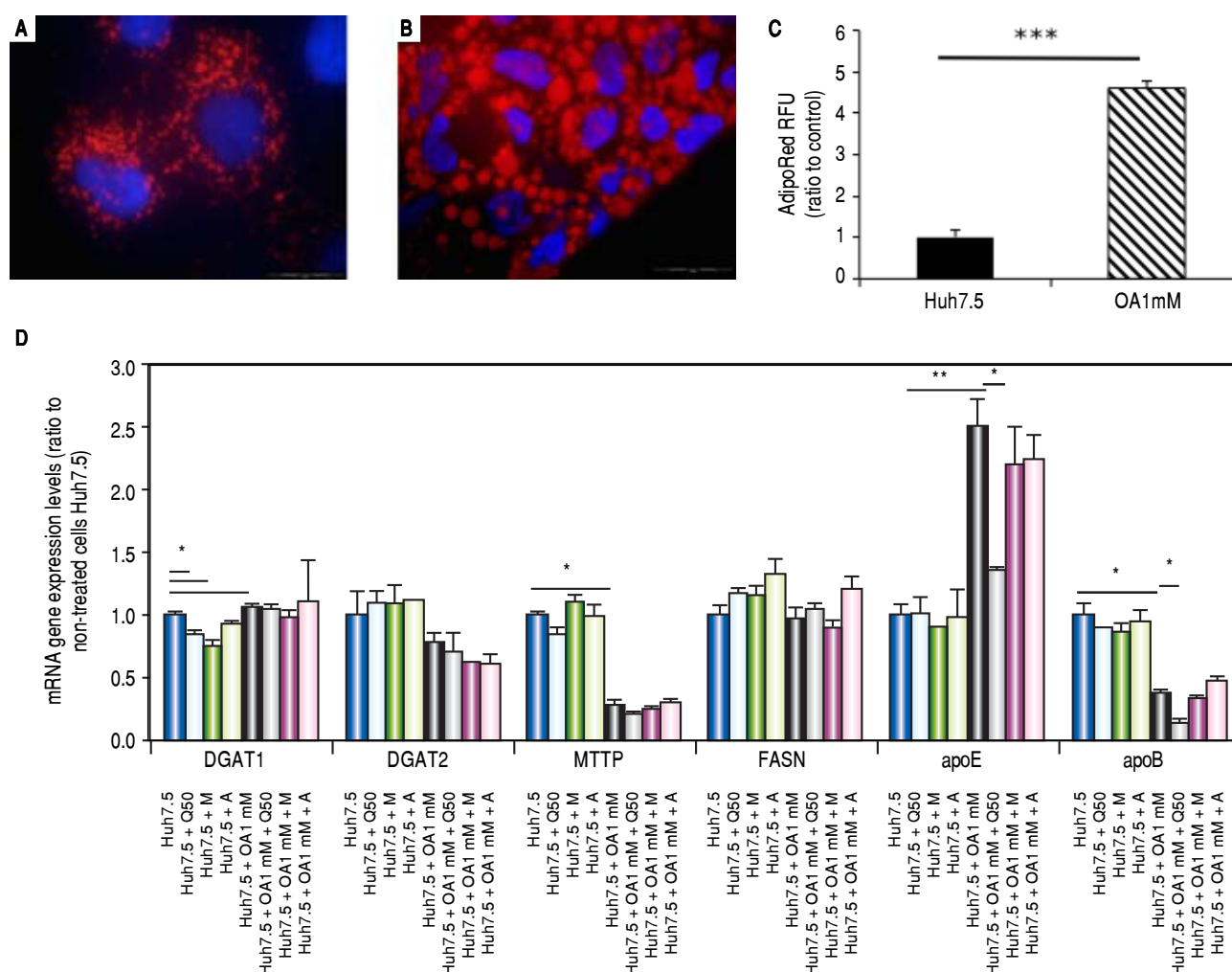


Figure 1. Untreated Huh7.5 (A) and Huh7.5 cells cultured at OA concentrations 1 mM, for 48 hours (B). LDs and nuclei were stained with ORO (red) and Dapi (blue), respectively. Images were acquired with a fluorescence microscope (OLIMPUS BX41) equipped with the standard epifluorescence filter set up for DAPI and FITC under oil with a 100x plan apochromat objective. C. Intracellular triglycerides concentration. AdipoRed™ Assay of Huh7.5 and OA-Huh7.5 cells. The intracellular triglycerides were stained and the concentration of triglycerides was quantified by fluorescence. (Huh7.5 fold=1) (***) $p < 0.01$. Data are presented as the mean values \pm SD obtained from three independent experiments. D. (A) mRNA gene expression levels of DGAT-1, DGAT-2, MTTP, FASN, apoE and apoB were determined by RT-PCR. Results were normalized using GAPDH and Huh7.5 non-treated cells were used as reference. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Data are the mean value \pm SD obtained from three independent experiments.

RESULTS

Huh7.5 PNPLA3 genotype

Huh7.5 cells presented unfavourable genotype GG for *PNPLA3* as previously was showed.¹⁸

Oleic acid-induced intracellular lipid accumulation in Huh7.5 cells

Using oil red staining we observed that untreated Huh7.5 cells revealed almost absence of intracellular lipid

(Figure 1A). However, as shown in figure 1B, after OA exposure LD were higher in number and size.

Using a fluorescence-based AdipoRed™ assay, the amount of intracellular lipids increased in the presence of OA $78.31 \pm 3.78\%$ compared to untreated cells (Figure 1C).

Effects of Quercetin and water-soluble extracts from mushroom and artichoke on hepatic lipid accumulation

First, we have determined the dose by cytotoxic assay and at 0.1 mg/mL no toxic effects were observed (data not

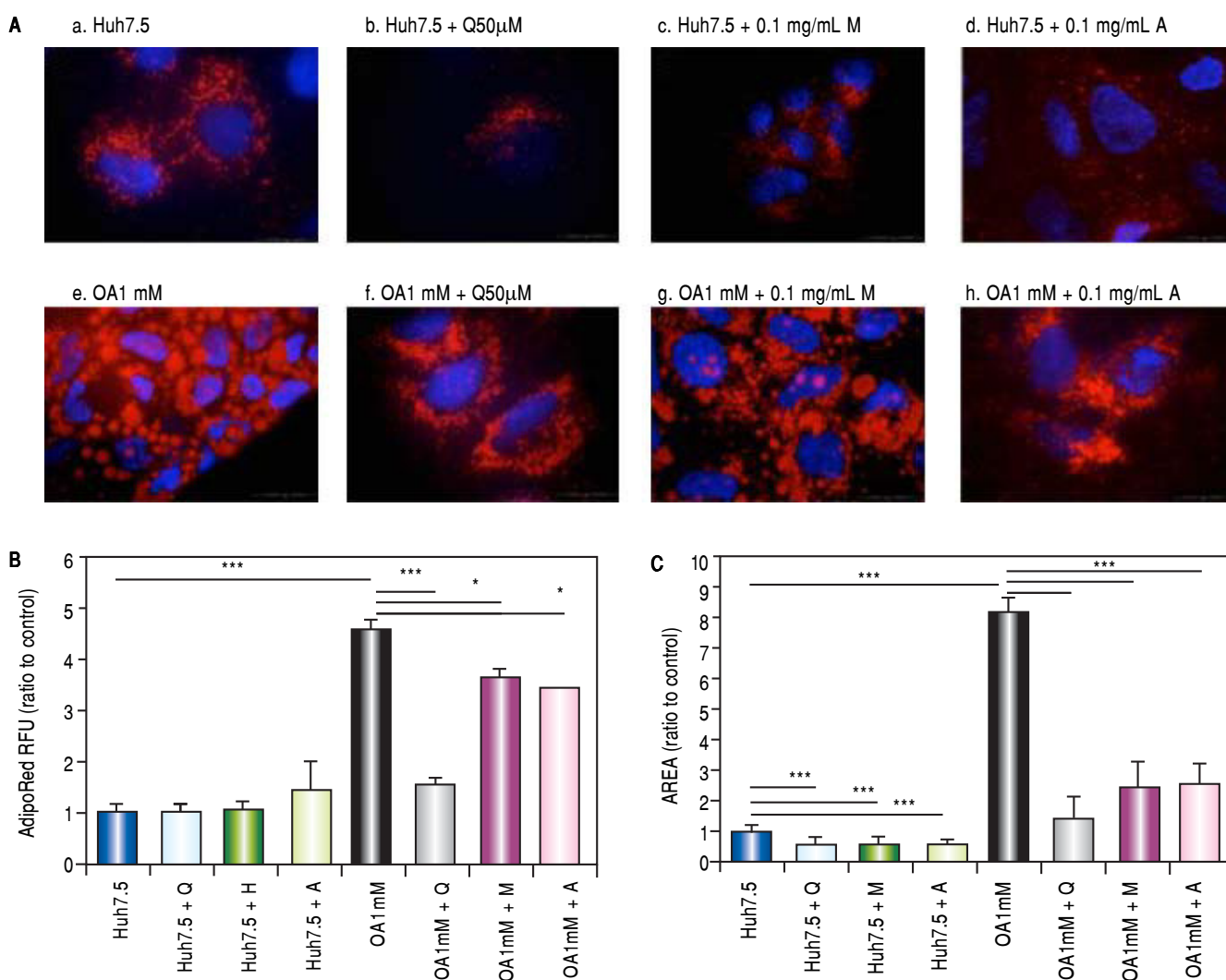


Figure 2. **A.** Huh7.5 (a) and OA-Huh7.5 (e) cells treated with quercetin 50 μM (b-f), aqueous extracts from mushroom (M) (c-g) and artichoke (A) (d-h) (0.1 mg/mL), for 48 h. LDs and nuclei were stained with ORO (red) and Dapi (blue), respectively. Images were taken using a fluorescence microscope (OLIMPUS BX41) equipped with a 100x objective and the standard epifluorescence filter set up for DAPI and FITC. **B.** LDs size were measured by Imaging Software cell[^]F Software. Results are expressed as fold-area μm³. **C.** Intracellular triglycerides concentration. AdipoRed Assay. The intracellular triglycerides were stained and the concentration of triglycerides was quantified by fluorescence (Huh7.5 fold = 1). Data are presented as the mean values ± SD obtained from three independent experiments. Experiments were performed in triplicate. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ (***) $p < 0.001$.

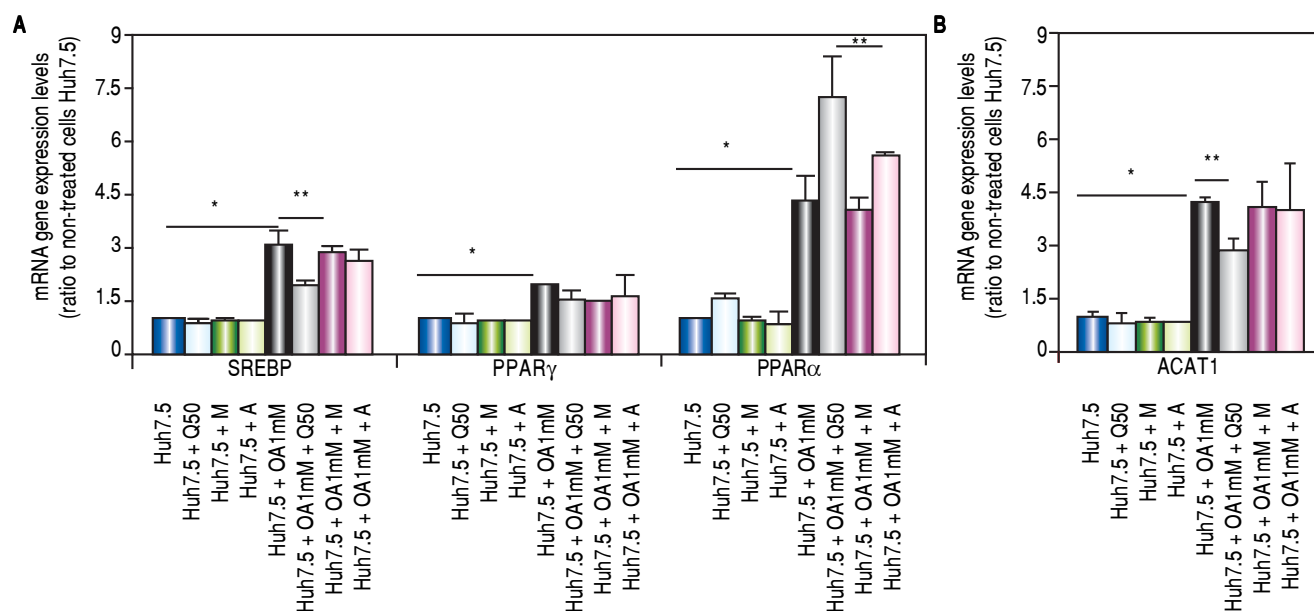


Figure 3. A. mRNA gene expression levels of SREBP-1c, PPAR γ and PPAR α were determined by RT-PCR. **B.** ACAT-1 mRNA gene expression levels. Results were normalized using GAPDH and Huh7.5 non-treated cells were used as reference. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Data are the mean value \pm SD obtained from three independent experiments.

shown). A significant reduction in lipid accumulation was observed by microscopy after quercetin or extracts addition (Figure 2A). After treatment, a significant reduction of the LD size in OA-treated cells was found (Figure 2B). Intracellular lipid concentration was decreased in OA-treated cells by quercetin ($66 \pm 2.04\%$), M aqueous extract ($20.40 \pm 3.63\%$) and A aqueous extract ($24.61 \pm 0.19\%$) (Figure 2C).

Aqueous extracts modulated lipogenesis-related gene expression

Genes involved in lipogenesis (SREBP-1c, PPAR γ and PPAR α), significantly increased in OA-induced Huh7.5 cells at the mRNA levels ($p < 0.05$) (Figure 3). As shown in figure 3A, quercetin treatment decreased the expression of SREBP-1c (fold inhibition: 1.57 ± 0.13) and PPAR γ (fold inhibition: 0.77 ± 0.10). The same effect was observed after treatment with the aqueous-extracts. Conversely, quercetin and artichoke extract increased the gene expression of PPAR α (Figure 3A). ACAT gene expression was increased by OA 1mM and decreased significantly (fold inhibition: 1.48 ± 0.3) after quercetin treatment being this reduction less significantly after extract addition (Figure 3B). Genes implicated on triglycerides and VLDL pathways were also modulated in OA-induced Huh7.5 cells. DGAT-1 and APOE mRNA levels were significantly increased and MTTP and APOB were decreased in OA-in-

duced Huh7.5 cells ($p > 0.05$). Quercetin and artichoke extract decreased DGAT1 mRNA levels in Huh7.5 and the apolipoproteins genes were repressed by quercetin in the OA-induced model (Figure 1D).

DISCUSSION

Current NAFLD therapies include lifestyle modifications, physical activity and medical intervention. Probiotics, functional food and several natural compounds (i.e. resveratrol and quercetin,²⁵ anthocyanins,²⁶ vitamin E²⁷) may be promising in helping therapeutic approaches. On the basis of these data, it seems that foods rich in quercetin and/or including natural extracts from mushroom and artichoke may be useful for the prevention of NAFLD.

In addition to resveratrol and quercetin, other polyphenols such as Anthocyanin Cy-3-g, Proanthocyanidins, Theaflavin (a flavan-3-ol) and Ellagic acid have been studied as potential agent for both prevention and treatment of hepatic steatosis.²⁸⁻³¹ Resveratrol is a stilbene occurring naturally in several plants and provided in the diet by various foodstuffs. In recent years, it has been shown to modify lipid metabolism, and more specifically to induce a reduction in liver triacylglycerol content.³²⁻³⁴

Quercetin is a natural polyphenol belonging to a group with a variable structure, known as flavonoids. It is found in onions, broccoli, tomatoes, apples and berries. Several

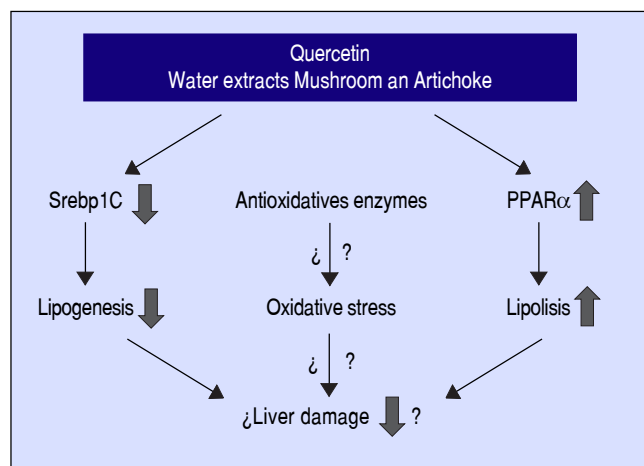


Figure 4. Possible mechanisms about the beneficial effects of quercetin and aqueous extracts in NAFLD.

studies have shown that quercetin has more than one effect in order to modify the intracellular lipid content.¹¹ Vid-yashankar and colleagues³⁵ showed that quercetin decreased triacylglycerol accumulation, modulated the insulin resistance, inflammatory cytokine secretion, and increased cellular antioxidants suggesting that quercetin could be an effective molecule for NAFLD.

In this study, we have shown that aqueous extracts from mushroom and artichoke may be useful for therapeutic interventions in lipid accumulation-related liver pathologies like NAFLD. Beneficial effects of polyphenols in the prevention and treatment of liver steatosis have been widely reported.^{25,36} These molecules present hepatic-protective effects because they reduce liver fat accumulation, mainly by lowering lipogenesis and increasing fatty acid oxidation. Besides, it has been shown that polyphenols are able to reduce oxidative stress and inflammation, the main factors responsible for liver damage.³⁷ To date, these beneficial effects have been demonstrated in cultured cells and animal models.

Quercetin was used as a reference or like a positive control.¹¹ Our results confirm that quercetin reduces TGs concentration and LDs size in an OA *in vitro* model. The use of aqueous extracts showed similar effects than quercetin such as an important reduction of intracellular lipid content, LD size and intracellular triglycerides concentration.

Lipid accumulation in the liver may be caused by enhanced de novo lipogenesis, activation of lipid uptake, and lowering of lipid catabolism. Fatty acids are known to be ligands for nuclear transcription factors, such as *SREBP-1c*, *PPARγ* and *PPARα*.³⁸ It has been reported that *PPARα* knockout (-/-) mice developed severe hepatic steatosis upon fasting as a result of failure to up-

regulate the fatty acid oxidation pathway.³⁹ *PPARα* activation is required to enhance hepatic lipid turnover to enable sufficient clearance of lipids from the liver, preventing lipid accumulation and peroxidation in murine NASH models.⁴⁰ Our result confirmed that the therapeutic effect of quercetin on lipid metabolism in Huh7.5-induced fatty liver cells is partly due to *PPARα* upregulation (inducing lipolysis) and *SREBP-1c* down-regulation (reducing lipogenesis).^{41,42} *Cynara scolymus* extract increased *PPARα* gene expression levels in the model of steatosis which controls fatty acid degradation. Anderson, *et al.* showed that pathogenesis of NASH increased the pool of free fatty acids through de novo lipid synthesis and nuclear receptors activation (*SREBP-1*, *ChREBP-1*, and *PPARγ*).⁴³ In our study, OA significantly increased *SREBP-1c* gene expression which was disrupted by quercetin. In addition, *PPARγ* gene expression was induced by OA and this effect was diminished after treatment. Besides, we demonstrated that OA modified genes involved in TGs synthesis and VLDL secretion pathway however quercetin and aqueous extracts treatment did not affect on their expression. This work demonstrated that *Agaricus bisporus* and *Cynara scolymus* aqueous extracts, together with quercetin treatment, modified nuclear transcription factors leading to a significant decrease of intracellular lipid content and LDs size.

In conclusion, these compounds may interfere and prevent the development of NAFLD in the presence of unfavourable genotype GG of *PNPLA3*. Quercetin and the aqueous extracts (A and M) may prevent the progression of liver damage related to NAFLD by two independent mechanisms: inhibition of lipogenesis by reducing *SREBP-1c* and promoting lipolysis through *PPARα* induction (Figure 4). Further studies are required to clarify the molecular mechanism including their role in the oxidative stress. In addition, it would be needed to test the specific effect of single compounds which are included in the aqueous extracts described in this work.

ABBREVIATIONS

- **A:** *Cynara scolymus*.
- **AbAE:** *Agaricus bisporus* aqueous extract.
- **ACAT:** Cholesterol acyltransferase.
- **APOB:** Apolipoprotein-B.
- **APOE:** Apolipoprotein-E.
- **DAPI:** 46-diamidino- 2-phenylindole.
- **DGAT-1:** Diacylglycerol acyltransferase-1.
- **DGAT-2:** Diacylglycerol acyltransferase-2.
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- **DMSO:** Dimethyl sulfoxide.

- **FASN:** Fatty Acid Synthase.
- **FBS:** Fetal bovine serum.
- **FFA:** Free fatty acid.
- **FITC:** Fluorescein isothiocyanate.
- **LDs:** Lipid droplets.
- **M:** *Agaricus Bisporus*.
- **MTTP:** Microsomal triglyceride transfer protein.
- **NAFLD:** Non-alcoholic fatty liver disease,
- **NASH:** Non-alcoholic steatohepatitis.
- **OA:** Oleic acid.
- **ORO:** Oil Red O.
- **PBS:** Phosphate-buffered saline.
- **PNPLA3:** Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3.
- **PPAR- α :** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha.
- **PPAR- γ :** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.
- **q-PCR:** Quantitative polymerase chain reaction.
- **RT:** Retro-transcription.
- **SD:** Standard deviation.
- **SREBP:** Sterol regulatory element binding protein-1.
- **TG:** Triglycerides.

NO FINANCIAL DISCLOSE

- **Financial support.** None.

POTENTIAL COMPETING INTEREST

None.

SPECIFIC AUTHOR CONTRIBUTION

- Planning and conducting the study: Ángela Rojas, Manuel Romero-Gómez.
- Drafting the manuscript: Ángela Rojas, Jose Antonio del Campo, Manuel Romero-Gomez.
- Interpreting data: Jose Antonio del Campo, Juan Bautista, Manuel Romero-Gomez.
- Performing *in vitro* studies: Ángela Rojas, Paloma Gallego, Antonio Gil-Gómez, Rocío Muñoz, Lourdes Rojas, Rosario Maldonado, Rocío Gallego-Durán, Marta García-Valdecasas.

REFERENCES

1. Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease 2015. *World J Hepatol* 2015; 18: 1450-9.
2. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 829-38.
3. Sung KC, Kim SH. Interrelationship between fatty liver and insulin resistance in the development of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1093-7.
4. Contos MJ, Choudhury J, Mills AS, Sanyal AJ. The histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 481-500.
5. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011; 332: 1519-23.
6. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009; 48: 1-26.
7. Kurek K, Piotrowska DM, Wiesiolek-Kurek P, Lukaszuk B, Chabowski A, Górski J, Zendzian-Piotrowska M. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2014; 34: 1074-83.
8. Liu Y, Wang D, Zhang D, Lv Y, Wei Y, Wu W, Zhou F, et al. Inhibitory effect of blueberry polyphenolic compounds on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. *J Agric Food Chem* 2011; 23: 12254-63.
9. Kang OH, Kim SB, Seo YS, Joung DK, Mun SH, Choi JG, Lee YM, et al. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 2578-86.
10. Hwang YJ, Wi HR, Kim HR, Park KW, Hwang KA. Pinus densiflora Sieb. et Zucc. alleviates lipogenesis and oxidative stress during oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Nutrients* 2014; 6: 2956-72.
11. Li X, Wang R, Zhou N, Wang X, Liu Q, Bai Y, Liu Z, et al. Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation in vitro in a NAFLD cell model. *Biomed Rep* 2013; 1: 71-6.
12. Peng H, He Y, Zheng G, Zhang W, Yao Z, Xie W. Meta-analysis of traditional herbal medicine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Biol* 2016; 62: 88-95.
13. Salomone F, Godos J, Zelber-Sagi S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. *Liver Int* 2016; 36: 5-20.
14. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 645-55.
15. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-5.
16. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2010; 285: 6706-15.
17. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 Variant Associated with Fatty Liver Disease (I148M) Accumulates on Lipid Droplets by Evading Ubiquitylation. *Hepatology* 2017 [Epub ahead of print].
18. Ampuero J, Del Campo JA, Rojas L, García-Lozano JR, Solá R, Andrade R, Pons JA, et al. PNPLA3 rs738409 causes steatosis according to viral & IL28B genotypes in hepatitis C. *Ann Hepatol* 2014; 13: 356-63.
19. Chavez-Tapia NC, Rosso N, Tiribelli C. Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 20.
20. Cremades O, Diaz-Herrero MM, Carbonero-Aguilar P, Gutierrez-Gil JF, Fontiveros E, Rodríguez-Morgado B, Parrado J, et al. Preparation and Characterisation of Selenium-Enriched Mushroom Aqueous Enzymatic Extracts (MAEE) Obtained from the White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Chemistry* 2012; 133: 1538-43.
21. Hu KQ, Yu CH, Mineyama Y, McCracken JD, Hillebrand DJ, Hasan M. Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398 a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol* 2003; 22: 757-63.

22. Clement S, Juge-Aubry C, Sgroi A, Conzelmann S, Paziienza V, Pittet-Cuenod B, Meier CA, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by adipose tissue induces direct lipid accumulation in hepatocytes. *Hepatology* 2008; 48: 799-807.
23. McMillian MK, Grant ER, Zhong Z, Parker JB, Li L, Zivin RA, Burczynski ME, et al. Nile Red binding to HepG2 cells: an improved assay for in vitro studies of hepatosteatosis. *In Vitro Mol Toxicol* 2001; 14(3): 177-90.
24. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
25. Pisonero-Vaquero S, Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S, Garcia-Mediavilla MV. Flavonoids and Related Compounds in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Therapy. *Curr Med Chem* 2015; 22: 2991-3012.
26. Zhang PW, Chen FX, Li D, Ling WH, Guo HH. A CONSORT-compliant randomized double-blind placebo-controlled pilot trial of purified anthocyanin in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94: e758.
27. Ji HF. Vitamin E therapy on aminotransferase levels in NAFLD/NASH patients. *Nutrition* 2015; 31: 899.
28. Guo H, Li D, Ling W, Feng X, Xia M. Anthocyanin inhibits high glucose-induced hepatic mtGPAT1 activation and prevents fatty acid synthesis through PKC. *J Lipid Res* 2011; 52: 908-22.
29. Baselga-Escudero L, Bladé C, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó MJ, Arola L, Arola-Arnal A. Grape seed proanthocyanidins repress the hepatic lipid regulators miR-33 and miR-122 in rats. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 1636-46.
30. PilHwang Y, Gyun Kim H, Choi JH, Truong Do M, Tran TP, Chun HK, Chung YC, et al. HG. 3-Caffeoyl 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* attenuates high glucose-induced hepatic lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the liver kinase B1 and silent information regulator T1/AMPK-dependent pathway. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 471-82.
31. Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese diabetic KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434: 486-91.
32. Gnoni GV, Paglialonga G. Resveratrol inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat hepatocytes. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 211-18.
33. Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 644-9.
34. Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 698-706.
35. Vidyashankar S, Sandeep Varma R, Patki PS. Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2013; 27: 945-53.
36. Van De Wier B, Koek GH, Bast A, Haenen GR. The Potential of Flavonoids in the Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 834-55.
37. Aguirre L, Portillo MP, Hijona E, Bujanda L. Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7366-80.
38. Jump DB, Tripathy S, Depner CM. Fatty Acid-Regulated Transcription Factors in the Liver. *Annu Rev Nutr* 2013; 33: 249-69.
39. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 123-32.
40. Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Mimani M, Hirasawa T, et al. Fenofibrate a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver Int* 2006; 26: 613-20.
41. Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, Klimis-Zacas D. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats. *British Journal of Nutrition* 2014; 111: 194-200.
42. Wang LL, Zhang ZC, Hassan W, Li Y, Liu J, Shang J. Amelioration of free fatty acid-induced fatty liver by quercetin-3-O-b-D-glucuronide through modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/sterol regulatory element-binding protein-1c signaling. *Hepatol Res* 2016; 46: 225-38.
43. Anderson N, Borlak J. Review. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 311-57.

Correspondence and reprint request:

Prof. Manuel Romero-Gómez, M.D., Ph.D.
 UCM Digestive Diseases. Virgen Macarena-Virgen del Rocío
 University Hospital. Institute of Biomedicine, University of
 Sevilla, Spain. Avd. Manuel Siurot. Edificio de Gobierno 1st floor.
 41013 Sevilla, Spain.
 Tel: (+34) 955 013 466 Fax: (+34) 955 013 465,
 E-mail: mromerogomez@us.es